



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2000

**Carla Alexandra
Pina da Cruz Nunes**

**Contribuição para a caracterização da
fracção de prolaminas de duas
variedades de sorgo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Química dos Produtos Naturais e Alimentos, realizada sob orientação da Prof. Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente:	Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro Professor Catedrático, do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro.
Vogais:	Doutor José Manuel Abecassis Empis Professor Associado com Agregação, do Departamento de Química, do Instituto Superior Técnico, da Universidade Técnica de Lisboa. Doutora Ivonne Delgadillo Professora Associada, do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro. Doutora Isabel Queiroz de Macedo Professora Auxiliar, do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro.

ao meu avô Alípio

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão à Doutora Ivonne Delgadillo, minha orientadora neste trabalho, pelo facto de me ter introduzido no mundo da investigação científica. Durante o período que tive o prazer de trabalhar com ela mostrou-se uma fonte inesgotável de conhecimentos, os quais me soube sempre transmitir. Tanto o seu estímulo como o seu apoio, quer pessoal quer profissional, foram uma constante ao longo do tempo.

À Doutora Isabel Macedo gostaria de agradecer o espírito crítico com que analisou os meus resultados.

Ao Dr. Paulo Marques gostaria de agradecer os bons momentos que passamos no laboratório, a colaboração constante e a amizade que foi nascendo ao longo do tempo.

Ao Doutor António Barros gostaria de agradecer a simpatia, a disponibilidade, a colaboração, o apoio e a amizade que me dispensou ao longo da elaboração da tese.

À Doutora Ana Gil e à Dr.^a Enrica Alberti gostaria de agradecer o facto de me terem adquirido e ajudado a interpretar os espectros de RMN.

Gostaria de agradecer à Dr.^a Ana Reis por ter sempre tratado do laboratório de forma exemplar e de me ter conseguido sempre ‘dar uma mãozinha’:

Gostaria também de agradecer a todos os elementos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, em particular ao ‘Grupo de Bioquímica e Química Alimentar’ que, de uma ou de outra forma, me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Como o trabalho não é tudo ... gostaria de agradecer, pelo espírito de companheirismo e amizade, ao “grupo da Pizzarte”.

E como não poderia deixar de ser, gostaria de agradecer à minha FAMÍLIA as palavras de apoio, de coragem e de confiança que tiveram sempre para mim. Obrigada por tudo...

Ao projecto Europeu INCO IC 18 CT 960051 gostaria de agradecer o apoio financeiro.

Resumo

O trabalho realizado ao longo desta tese teve como principal objectivo conseguir prestar uma contribuição para o melhor conhecimento da fracção de prolaminas de sorgo.

No primeiro capítulo da tese é efectuada uma revisão bibliográfica tendo em vista o conhecimento geral do referido cereal: nomenclatura utilizada em diferentes países, enquadramento do sorgo na família das *Poaceae*, países produtores de maior relevância, características da planta e do próprio grão, composição proteica. Neste capítulo é também abordado o problema da digestibilidade das proteínas de sorgo assim como da presença de compostos fenólicos.

No segundo capítulo procede-se a uma descrição exaustiva dos métodos experimentais utilizados ao longo da realização experimental da tese.

No capítulo III são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Numa primeira parte é efectuada uma caracterização dos perfis electroforéticos das fracções de prolaminas de duas variedades de sorgo e detecção de diferenças que ocorrem quando as prolaminas são extraídas a partir de farinhas cozidas. Numa segunda parte tenta-se o fraccionamento das prolaminas de sorgo por cromatografia de exclusão molecular. Algumas das fracções assim obtidas foram analisadas por FTIR. Desenvolveram-se métodos de remoção dos compostos polifenólicos da fracção de prolaminas. As amostras obtidas por estes métodos foram analisadas por FTIR e RMN. Para conhecer mais pormenorizadamente a composição de cada um dos constituintes testou-se um método de SDS-PAGE semi-preparativo. Os resultados obtidos por este processo contribuem para a compreensão do que ocorre na fracção de prolaminas de sorgo aquando do cozimento.

Como anexo mostra-se a aplicação de análise de componentes principais às análises de espectros de FTIR de prolaminas assim como a géis de SDS-PAGE. Também em anexo, apresenta-se uma pequena listagem de produtos tradicionais confeccionados com farinha de sorgo.

Palavras Chave: sorgo, prolaminas, digestibilidade, polifenóis, SDS-PAGE, FTIR.

Abstract

The work carried through this thesis had as main purpose to give a contribution for the best knowledge of the sorghum prolamin fraction.

In the first chapter of the thesis a bibliographical review a general information about this cereal was carried out: nomenclature used in different countries, integration of sorghum in the family of the *Poaceae*, producer countries, characteristics of the plant and the grain itself, proteic composition. In this chapter the problem of the sorghum protein digestibility as well as the phenolic presence was also discussed.

In the second chapter an exhausting description of the experimental methods used through the experimental part of the thesis is done.

In chapter III they were presented and argued the obtained results. In a first part a characterisation of the electrophoretic profiles of the prolamin fractions of two sorghum varieties was done. It was also achieved the detention of some differences that occur when the prolamin are extracted from cooked flours. In a second part the fractionation of prolamins by size exclusion chromatography was tried. Some of the obtained fractions were analysed by FTIR. Methods for polyphenols removal out from the prolamin fraction were developed. The samples obtained by these methods had been analysed by FTIR and RMN. To know in more detail the composition of each one of the constituents of the prolamin fractions a semi-preparative SDS-PAGE method was tested. The results obtained by that method contribute for the understanding of occurs in the sorghum prolamin fraction when extracted from cooked flour. In annex it was shown the application of PCA into FTIR prolamin spectra and also into SDS-PAGE. In annex was also presented a small list of traditional products made with sorghum flour.

Key words: sorghum, prolamins, digestibility, polyphenols, SDS-PAGE, FTIR.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. O PROBLEMA DA DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SORGO	16
3. FORMAS DE CONSUMO.....	17
4. NOMENCLATURA	21
5. ORIGENS E PRODUÇÃO ACTUAL	22
6. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA E DO GRÃO	23
7. ESTRUTURA DO GRÃO DE SORGO	24
8. AS PROTEÍNAS DO SORGO.....	27
8.1. Composição em aminoácidos das prolaminas	30
8.2. Efeito do tratamento térmico nas prolaminas	31
9. A PRESENÇA DE POLIFENÓIS NO SORGO	33
10. CONSIDERAÇÕES SOBRE INTERACÇÕES DE PROTEÍNAS	36
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS	43
1. AMOSTRAS	43
2. FRACÇIONAMENTO PROTEICO	44
3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	46
3.1 Separação electroforética	46
3.2. Revelação de proteínas	47
3.3. SDS-PAGE Semi-Preparativa.....	48
4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	49
5. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283	50

6. CROMATOGRAFIA DE COLUNA	51
6.1. Cromatografia de exclusão molecular de baixa pressão	51
6.1.1. <i>Fraccionamento da fracção de prolaminas 1 de duas variedades de sorgo...</i>	51
6.1.2. <i>Remoção de polifenóis da fracção de prolaminas 1 da variedade NK283</i>	52
6.2. HPLC	53
6.2.1. <i>Separação de prolaminas</i>	53
6.2.2. <i>Obtenção dos perfis cromatográficos das prolaminas da variedade NK283...</i>	53
7. FTIR	54
8. RMN	54
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
1. INTRODUÇÃO	57
2. CARACTERIZAÇÃO DAS FRACÇÃO DE PROLAMINAS DE DUAS VARIEDADES DE SORGO	59
2.1. Caracterização electroforética.....	59
2.1.1. <i>Prolaminas 1 extraídas a partir da variedade NK283.....</i>	59
2.1.2. <i>Prolaminas 2 extraídas a partir da variedade de sorgo NK283</i>	63
2.1.3. <i>Prolaminas 1 extraídas a partir da variedade Kenyan Local White.....</i>	66
2.1.4. <i>Prolaminas 2 extraídas a partir da variedade Kenyan Local White.....</i>	68
2.1.5. <i>Conclusões.....</i>	70
2.2. Caracterização das Prolaminas da Variedade NK283 por RP-HPLC.....	71
2.2.1. <i>Separação de prolaminas P1 da variedade NK283 por RP-HPLC</i>	72
2.2.2. <i>Obtenção dos perfis cromatográficos das prolaminas da variedade NK283...</i>	75
2.2.3. <i>Conclusões e discussão</i>	75
3. FRACCIONAMENTO DAS PROLAMINAS 1 DE DUAS VARIEDADES DE SORGO	77
3.1. Prolaminas 1 da variedade NK283	77
3.2. Prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White.....	80
3.3. Conclusões	83

4. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283.....	85
4.1. Extração com solventes orgânicos	85
4.2. Diálise na presença de SDS	85
4.3. C.E.M. usando ureia e SDS como eluente	86
4.3.1. RMN.....	88
4.4. Conclusões e discussão	93
5. ABORDAGEM AO PROBLEMA DA DIMINUIÇÃO DE DIGESTIBILIDADE DAS PROLAMINAS COM O COZIMENTO.....	95
Conclusões e discussão	99
6. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO DE PROLAMINAS POR FTIR.....	101
Conclusões	104
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	107
TRABALHO FUTURO	111
ANEXO I - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS APLICADA A ESPECTROS DE FTIR DE AMOSTRAS DE PROLAMINAS	113
ANEXO II - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS APLICADA A SDS-PAGE	115
ANEXO III - PRODUTOS ALIMENTARES À BASE DE SORGO	121
CAPÍTULO V – BIBLIOGRAFIA.....	125

Índice de Figuras

Fig. 1 - Produção de sorgo a nível mundial. A azul escuro estão assinalados os países produtores e a azul claro os países de origem.....	22
Fig. 2 - Planta de sorgo.....	24
Fig. 3 - Esquema de um grão de sorgo.....	26
Fig. 4 - Estrutura molecular de 4-flavenol.....	33
Fig. 5 - Estrutura de um fragmento de uma cadeia polipeptídica, em conformação trans. ϕ e ψ representam os ângulos de rotação em torno do C α . R ₁ , R ₂ e R ₃ estão em posição trans.....	36
Fig. 6 - Esquema do tipo de fraccionamento proteico utilizado.....	45
Fig. 7 - Perfil electroforético da amostra de P1 , extraída a partir de farinha não cozida da variedade de sorgo NK283 , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	59
Fig. 8 - Perfil electroforético da amostra de P1 , extraída a partir de farinha cozida da variedade de sorgo NK283 , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	60
Fig. 9 - Amostra de glutelinas (a) não reduzidas e (b) reduzidas, extraídas a partir de farinha cozida da variedade NK283 analisada por SDS-PAGE em gel de acrilamida 15 %.....	62
Fig. 10 - Amostra de glutelinas (a) não reduzidas e (b) reduzidas, extraídas a partir de farinha da variedade NK283 analisada por SDS-PAGE em gel de acrilamida 15 %.....	63
Fig. 11 - Perfil electroforético da amostra de P2 , extraída a partir de farinha não cozida da variedade de sorgo NK283 , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	64
Fig. 12 - Perfil electroforético da amostra de P2 , extraída a partir de farinha cozida da variedade de sorgo NK283 (a) não reduzida e (b) reduzida.....	65
Fig. 13 - Perfil electroforético da amostra de P1 , extraída a partir de farinha não cozida da variedade de sorgo Kenyan Local White , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	66
Fig. 14 - Perfil electroforético da amostra de P1 , extraída a partir de farinha cozida da variedade de sorgo Kenyan Local White , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	67
Fig. 15 - Perfil electroforético da amostra de P2 , extraída a partir de farinha não cozida da variedade de sorgo Kenyan Local White , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	68
Fig. 16 - Perfil electroforético da amostra de P2 , extraída a partir de farinha cozida da variedade de sorgo Kenyan Local White , (a) não reduzida e (b) reduzida.....	69
Fig. 17– (I) Cromatogramas de RP-HPLC (Merck 50983 Lichrospher 100 RP18) referentes às amostras P 1 e P2 extraídas a partir de farinha crua e cozida (detecção 210 nm com gradiente linear de 65 a 100 % de acetonitrilo durante 25 minutos) (II) Caracterização electroforética das fracções referentes à amostra P1.....	74
Fig. 18 - Cromatograma referente à C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade	

NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.....	78
Fig. 19 - SDS-PAGE da principais fracções cromatográficas da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.....	78
Fig. 20 - Cromatograma referente à cromatografia de exclusão molecular da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.....	80
Fig. 21 - SDS-PAGE das fracções cromatográficas da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente.....	81
Fig. 22 - SDS-PAGE das fracções finais da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. A - aglomerados de elevado peso molecular + 45 kDa; B - fracção enriquecida com 45 kDa; C - 45 kDa + kafirina $\alpha + \gamma$; D - fracção enriquecida com kafirinas $\alpha + \gamma$; E - kafirina β + polifenóis; F - kafirina β + 14 kDa.....	82
Fig. 23 - SDS-PAGE de uma amostra de prolaminas 1 de sorgo apresentando, na sua composição, polifenóis.....	85
Fig. 24 - Espectros de FTIR das amostras de proteína (a) antes do tratamento para remoção de polifenóis (b) após tratamento com diálise e (c) após tratamento por C.E.M. Ambos os tratamentos envolveram SDS.....	86
Fig. 25 - Cromatograma referente à C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v).....	87
Fig. 26 - SDS-PAGE das fracções da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v).....	87
Fig. 27 - Espectros de RMN no estado sólido da amostra de prolamina 1 da variedade NK283 antes do tratamento cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v). (a) CP MAS; (b) SPE; (c) ^1H -MAS.....	90
Fig. 28 - Espectros de RMN no estado sólido da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 após do tratamento cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3M e SDS 1% (m/v). (a) CP MAS; (b) SPE; (c) ^1H -MAS.....	92
Fig. 29 - Composição dos polipéptidos obtidos por SDS-PAGE preparativa da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 e das amostras de prolaminas 1 e 2 das farinhas cozidas variedades NK283 e Kenyan Local White. As fracções apresentadas são referentes a: 1 - aglomerados de elevado peso molecular, superior a 97 kDa; 2 - proteína de 66 kDa, 3 - proteína de 45 kDa; 4 - kafirinas $\alpha + \gamma$, 5 - kafirina β , 6 - proteína de 14 kDa e 7-polifenóis.....	96
Fig. 30 - Resultados de Ureia-PAGE das fracções correspondentes aos polipéptidos de > 97 kDa e 66 kDa das prolaminas 1 e 2 (P1 e P2) extraídas a partir de farinha cozida das variedades NK283.....	98
Fig. 31 - Espectros de FTIR das amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas de farinha crua	

e de farinha cozidas as variedades NK283 e Kenyan Local White.....	101
Fig. 32 - Espectros parciais referentes às amostras obtidas por fraccionamento com C.E.M. resina Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. (a) fracção rica em aglomerados de elevado peso molecular (corresponde à fracção A da Fig. 23); (b) fracção enriquecida na proteína de 45 kDa (corresponde à fracção B da Fig. 23) e (c) fracção constituída principalmente pela kafirina $\alpha+\gamma$ (corresponde à fracção E da Fig. 23).....	102
Fig. 33 - Espectros parciais referentes às amostras obtidas por fraccionamento com C.E.M. resina Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. (a) fracção rica em aglomerados de elevado peso molecular (corresponde à fracção A da Fig. 23); (b) fracção enriquecida na kafirina β e contendo polifenóis (corresponde à fracção D da Fig. 23).....	103
Fig. 34 - Projecção das amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas de farinha crua e cozida das variedades NK283 e Kenyan Local White analisadas por FTIR.....	113
Fig. 35 - Números de onda que contribuem para a discriminação entre espectros de FTIR de amostras de prolaminas extraídas a partir de farinha crua e espectros de FTIR de amostras de prolaminas extraídas de farinha cozida.....	114
Fig. 36 - Projecção das amostras da variedade NK283.....	115
Fig. 37 - Coordenadas factoriais referentes às amostras da variedade NK283.....	116
Fig. 38 - Projecção das amostras da variedade Kenyan Local White.....	117
Fig. 39 - Coordenadas factoriais referentes às amostras da variedade Kenyan Local White.....	118

Índice de Tabelas

Tab. 1 - Composição em aminoácidos (mole %) das kafirinas α β e γ , segundo Watterson <i>et al.</i> (1993).....	31
Tab. 2 - Sumário dos resultados obtidos por RP-HPLC preparativo.....	72
Tab. 3 - Composição dos polipéptidos obtidos por SDS-PAGE preparativa.....	97

Abreviaturas

APS - Persulfato de amônio.

C.E.M. - Cromatografia de exclusão molecular.

DTT - 1,4 – ditioneitol.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação.

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

P1 - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol a partir da farinha de sorgo crua.

P1C - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol a partir da farinha de sorgo cozida.

P1CR - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol a partir da farinha de sorgo cozida, na sua forma reduzida.

P1R - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol a partir da farinha de sorgo crua, na sua forma reduzida.

P2 - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol e agente redutor a partir da farinha de sorgo crua.

P2C - Prolaminas extraídas com *terc*- butanol e agente redutor a partir da farinha de sorgo crua.

P2CR - Prolaminas extraídas da farinha de sorgo crua, com *terc*-butanol e agente redutor, na sua forma reduzida.

P2R - Prolaminas extraídas com *terc*-butanol e agente redutor a partir da farinha de sorgo crua, na sua forma reduzida.

RP-HPLC - Cromatografia de elevada performance com fase reversa.

r.p.m. - Rotações por minuto.

RMN - Ressonância magnética nuclear.

SDS - Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina.

TFA - Ácido trifluoracético.

Tris – 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

"Fools that you are! To think you should learn from your own mistakes.
You should learn from the mistakes of your enemies and avoid the cost of your own."
Otto von Bismarck

1. INTRODUÇÃO
2. O PROBLEMA DA DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SORGO
3. FORMAS DE CONSUMO
4. NOMENCLATURA
5. ORIGENS E PRODUÇÃO ACTUAL
6. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA E DO GRÃO
7. ESTRUTURA DO GRÃO DE SORGO
8. AS PROTEÍNAS DO SORGO
 - 8.1. Composição em aminoácidos das prolaminas
 - 8.2. Efeito do tratamento térmico nas prolaminas
9. A PRESENÇA DE POLIFENOIS NO SORGO
10. CONSIDERAÇÕES SOBRE INTERACÇÕES DE PROTEÍNAS

1. INTRODUÇÃO

Desde há muitos séculos que o sorgo tem sido o alimento básico das regiões semi-áridas tropicais da África e da Ásia. Este cereal, em conjunto com o milho, tem sido a principal fonte de energia, de proteínas, de vitaminas e minerais para milhões de habitantes pobres dessas regiões. Nestas regiões, na sua maioria subdesenvolvidas, as populações apresentam diversos graus de subnutrição. O referido cereal, especialmente após ser cozinhado, apresenta valores de digestibilidade aquém dos restantes cereais.

Muito trabalho tem sido desenvolvido numa tentativa de encontrar a origem da diminuição da digestibilidade com o cozimento. Apesar de se continuar a desenvolver pesquisa neste tópico, há informações contraditórias, as publicações têm vindo a escassear nos últimos anos e ainda não existe uma explicação definitiva para o fenómeno.

Uma vez que a fracção de prolaminas de sorgo, até à data, não foi exaustivamente estudada, nomeadamente no que diz respeito às modificações dos perfis electroforéticos em função do tratamento térmico e existem poucas informações sobre dados cromatográficos e espectroscópicos. É objectivo deste trabalho contribuir para um melhor conhecimento da fracção das prolaminas e em consequência para a compreensão do problema da causa da deficiente digestibilidade da proteínas deste cereal.

2. O PROBLEMA DA DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE SORGO

Estudos publicados acerca da aparente disponibilidade das proteínas de sorgo indica que as proteínas deste são mais dificilmente digeridas do que as dos restantes cereais (Axtell *et al.*, 1981). De facto, estudos de digestibilidade, efectuados em humanos revelam que isso ocorre, na realidade. Kurien *et al.*, em 1960, efectuaram um estudo com rapazes de idade compreendidas entre 10 e 11 anos. Alimentaram-os com papas de farinhas de sorgo sem taninos e com pão indiano feito de sorgo. Concluíram que a digestibilidade destes produtos é inferior a de produtos de outros cereais. Os valores de digestibilidade aparente determinada foram de 46 % para papas e de 55 % para o pão indiano. Resultados similares foram obtidos por Daniel *et al.* em 1966. Desta vez os estudos foram efectuados em raparigas alimentadas com dieta à base de sorgo. Graham e MacLean (1980) alimentaram crianças de 6-27 meses com um conjunto de duas variedades de sorgo rico em lisina e duas variedades de sorgo com teores normais desse aminoácido. O valor médio de digestibilidade aparente encontrado para papas de sorgo cozinhadas, foi de 46 %. Este valor é bastante inferior quando comparado com 81 % para o trigo, 73 % para o milho e 66 % para o arroz.

Uma vez que as possibilidades de efectuar estudos de digestibilidade *in vivo*, principalmente com crianças, são restritas, Axtell *et al.*, em 1981, desenvolveram um método para determinar a digestibilidade *in vitro*. Este método revelou resultados semelhantes aos ensaios efectuados, até aquela data, com humanos. Este tipo de ensaios *in vitro* foram efectuados com pepsina de porco e farinha de sorgo cozida em água. Os resultados, por ele obtidos, demonstraram que a digestibilidade da farinha de sorgo cozinhada em água diminui substancialmente com o cozimento (Axtell *et al.*, 1981 e

Hamaker *et al.*, 1986). Desta forma inferiu-se que o cozimento altera, de alguma forma, as proteínas de sorgo tornando-as menos digeríveis (Hamaker *et al.*, 1987). Ensaio de digestibilidade efectuados com tripsina/quimiotripsina ou mesmo com pepsina seguida de tripsina/quimiotripsina confirmaram que a digestibilidade das proteínas de sorgo diminui aquando do cozimento (Hamaker *et al.*, 1986).

Estudos de digestibilidade efectuados em animais comprovaram, de igual modo, a redução da digestibilidade de proteínas de sorgo com o cozimento (Hamaker *et al.*, 1987). Mitarau *et al.* (1985) determinaram que, em farinhas com baixos teores em taninos, as aves digerem com maior dificuldade (31,5 %) as proteínas de grão de sorgo cozido relativamente à farinha de sorgo crua. De forma similar Eggum *et al.* (1983) verificaram, em ratos, uma redução (7 %) na digestibilidade da proteínas da farinha de sorgo cozido.

3. FORMAS DE CONSUMO

Setenta por cento da proteína disponível, a nível mundial, para consumo humano é proveniente das plantas. Dentro destas os cereais contribuem com cerca de 50 % (Chung e Pomeranz, 1985).

O sorgo é um dos quatro cereais mais utilizado para consumo humano. Constitui a base alimentar para as pessoas que habitam em regiões semi-áridas tropicais de certas regiões de África, Ásia e América Latina (Oria *et al.*, 1995). É, também, o cereal mais utilizado para rações animais na América e na Europa (Hamaker *et al.*, 1987).

Por norma, o sorgo é consumido no local onde é produzido. Este cereal é empregue tanto para alimentação humana como para alimentação animal. Até ao início da década de sessenta, uma enorme fracção do sorgo produzido era utilizado para alimentação humana. Desde essa altura a produção com esta finalidade tem vindo a diminuir progressivamente. Entretanto a utilização de sorgo para alimentação animal duplicou, em 1988, passando de 30 para 60 % desde os anos sessenta (FAO, 1995).

Na maioria dos casos os consumidores de dietas à base de sorgo habitam zonas rurais pobres nas quais a maioria da população é subnutrida e está muito dependente da disponibilidade proteica e energética desse cereal (Oria *et al.*, 1995). Torna-se, então,

imperativo considerar a qualidade, quantidade e disponibilidade dos nutrientes do grão (Hamaker *et al.*, 1987).

Tradicionalmente o sorgo é consumido na forma de papas, pão não levedado, bebidas maltadas, pipocas, cerveja opaca e xarope.

Para produção de alimentos a partir do sorgo é comum recorrer-se aos processos seguintes: maltagem, fermentação e / ou cozimento. Após cozimento da farinha de sorgo ocorrem alterações na qualidade proteica (Rom, *et al.*, 1992).

A maltagem e fermentação são processos que melhoram a qualidade nutricional do grão, uma vez que promovem alterações na composição química e são responsáveis pela redução de factores antinutricionais, como é o caso do ácido fítico e de polifenóis (Chavan e Kadam, 1989).

Grande parte do sorgo consumido é previamente decorticado, desta forma, com o descasque as camadas mais exteriores do grão são removidas. O processamento em causa pode chegar a remover entre 12-30 % do grão. Há, então, uma redução dos níveis de fibra alimentar, cinza e lípidos. Uma vez que uma porção considerável do gérmen do cereal é removido, o teor em lisina é também significativamente reduzido, assim como os teores em histidina e arginina (Serena-Saldivar *et al.*, 1987 a, 1987 b e 1994; Eggum *et al.*, 1983). O processo de descasque está relacionado com a redução de taninos do grão. Quando o descasque remove 37 % do grão, esta redução pode ser de 4,5 para 0,2 equivalentes de catequina (Chibber *et al.*, 1978 e Nwasaru *et al.*, 1988). Em 1980, Chibber *et al.* determinaram que a redução do teor em taninos do grão de cereal é acompanhada por um incremento na digestibilidade de proteína do grão; incremento este, expresso em termos de quantidade de proteína.

O cozimento de farinha de sorgo reduz significativamente a digestibilidade das suas proteínas (Hamaker *et al.*, 1987). O sorgo pode ser cozinhado em meio alcalino para a produção de alimentos como *tô* e *tortillas*. Estas condições de cozimento apresentam um leve efeito negativo no que diz respeito à disponibilidade proteica; quando a farinha de sorgo é cozinhada nestas condições verifica-se, também, uma ligeira diminuição da digestibilidade proteica *in vivo* (Serna-Saldivar *et al.*, 1987a e 1988). Aquando da preparação de *tortillas*, em meio alcalino, ocorre uma redução progressiva da extractibilidade de albuminas, globulinas e prolaminas, com um conseqüente incremento da fracção de proteína residual (Vivas-Rodriguez *et al.*, 1987; Vivas-Rodriguez *et al.*,

1990). Neste caso, a digestibilidade *in vitro*, com pepsina, mostrou uma redução drástica nos valores de digestibilidade. O referido valor é menos de metade do valor determinado para a digestibilidade de farinha de sorgo crua (Serena-Saldivar, *et al.* 1987b e 1988).

Vivas Rodriguez *et al.* (1992) encontraram valores de digestibilidade de proteína reduzidos para farinha de sorgo decorticada ou inteira, processada sob a forma de *tô* ácido, neutro e alcalino.

Alguns dos grãos de cereais são escaldados para facilitar o seu descasque. Com este processo o pericarpo é removido mais facilmente, uma vez que o endosperma fica mais estruturado. Este processamento é particularmente útil em variedades de sorgo de endosperma mole (Young *et al.*, 1990). Serna-Saldivar *et al.* (1994) encontraram algumas diferenças entre sorgo escaldado antes do descasque e sorgo apenas decorticado; por exemplo, a perda de lípidos, de cinza e de fibra insolúvel. No entanto, estas diferenças encontradas na composição química foram mínimas e tanto o valor nutricional como os valores de digestibilidade proteica permaneceram inalterados.

Quando variedades de sorgo são tratadas com CaO, K₂CO₃, NH₄OH e NaHCO₃ o teor em taninos é reduzido e paralelamente, o valor nutricional é incrementado até ao nível do referente a sorgo com teor em taninos reduzido (Mukuru *et al.*, 1988).

O sorgo é frequentemente submetido a maltagem (Palmer *et al.*, 1989). Este é maltado para a produção de cerveja opaca, papas para bebés e ainda pratos tradicionais. As alterações sofridas pelo grão, aquando do processo de maltagem, foram estudadas por Chavan e Kadam em 1989 (Chavan e Kadam, 1989). Com este estudo verificou-se que a maltagem ocasiona entre 8-30 % de perda de matéria seca. A percentagem de prolaminas do grão diminui, assim como o teor em lípidos, taninos e amido. A percentagem de aminoácidos livres é incrementada, juntamente com albuminas, lisina, açúcares redutores e vitaminas (ocorre um aumento da síntese de vitamina B12 e C) (Almeida-Domingues *et al.*, 1993; Taylor, 1983; Wu e Wall, 1980).

O incremento do teor de lisina no grão é devido ao facto da fracção de albuminas aumentar e a de prolaminas diminuir (Wu e Wall, 1980). De acordo com Taylor (1983) tanto a fracção de prolaminas como a de glutelinas diminui com a maltagem, enquanto que o azoto solúvel e a fracção de albuminas e globulinas aumenta. Consequentemente o valor nutricional de farinha de sorgo maltada é superior ao valor nutricional da farinha sem tratamento.

A activação de amilases, proteases, fitases e de enzimas degradadoras de fibra dá origem a um ataque dos corpos proteicos (Taylor *et al.*, 1985) e a matriz proteica, promovendo, assim, a ruptura de polímeros, convertendo-os em compostos de estrutura mais simples e mais facilmente acessíveis (Aisien *et al.*, 1986; Watson e Novellie, 1975).

Os produtos fermentados de sorgo são muito consumidos na Índia e em muitos países da África central e do sul. A fermentação envolve, normalmente, maltagem prévia ou fermentação ácida desenvolvida por culturas mistas de leveduras e *lactobacillus*. A fermentação causa degradação dos constituintes do grão, em particular do amido e dos açúcares solúveis. Esta degradação ocorre por acção de enzimas do próprio grão como por acção de enzimas do meio fermentativo (Chavan e Kadam, 1989).

Os cereais fermentados apresentam uma digestibilidade superior à dos não fermentados. A qualidade proteica é superior no caso dos cereais fermentados por a fracção proteica ser mais facilmente digerida. A composição em aminoácidos é mais equilibrada, uma vez que ocorre a síntese de aminoácidos importantes do ponto de vista nutricional (Chavan e Kadam, 1989).

Os produtos fermentados são, também, mais ricos em vitaminas; estas são sintetizadas pelos microrganismos fermentativos.

Eggum *et al.* (1983) estudaram alguns dos produtos obtidos por fermentação de farinha de sorgo entre os quais pode referir-se: *kisra*, *aceda*, *ugali* e *marissa*. O estudo englobou a comparação entre o valor nutricional dos produtos fermentados e das correspondentes farinhas cruas decorticadas. Os produtos fermentados apresentaram valores de digestibilidade proteica superior aos correspondentes valores das farinhas não fermentadas. Verificaram que quando os produtos fermentados eram cozidos a digestibilidade diminuía. Axtell *et al.* (1981) estudaram *kisra* e *abrey*. Os resultados encontrados, no que diz respeito a valores de digestibilidade, foram congruentes com os resultados obtidos por Eggum *et al.* (1983).

Kheptarpaul e Chauhan (1990) estudaram a digestibilidade do amido de sorgo germinado e fermentado *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que a digestibilidade aumenta com a germinação e ainda mais com a fermentação.

El-Tinay *et al.* (1979) estudaram o processamento de um produto fermentado de sorgo – *kisra*. No que diz respeito à fracção de vitaminas, a tiamina aumentou ligeiramente, a niacina aumentou de forma considerável e os níveis de riboflavina mantiveram-se

inalteráveis, durante o processo de produção. Neste produto fermentado foi notado um incremento considerável dos valores de digestibilidade proteica.

Um outro processo utilizado é a extrusão. Este processamento, que envolve temperatura elevada e humidade reduzida, promove a ruptura do corpo proteico e é responsável por um incremento dos valores de digestibilidade do sorgo. Em amostras de farinhas de sorgo submetidas a extrusão determinou-se que a fracção de prolaminas 1 é quantitativamente superior à fracção de prolaminas 2, determinou-se também que a fracção de glutelinas é, também, incrementada (Hamaker, *et al.* 1994).

4. NOMENCLATURA

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] em diferentes países é conhecido com denominações distintas. Na África ocidental é conhecido por milho da Guiné, na África austral é denominado *kafir*, é conhecido por *durra* no Sudão, por *mtama* na África oriental, por *iowar* na Índia e por *kaoliang* na China (Purseglove, 1972).

O sorgo pertence às *Panicoideae*; família das *Poaceae* sub-família *Andropogonoideae*. A cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) também pertence às *Andropogonoideae*, sendo, portanto, parente próximo do sorgo. O género *Sorghum* caracteriza-se pela presença de espigas que nascem aos pares. A planta é anual, mesmo sendo uma erva perene. Nos trópicos podem efectuar-se colheitas deste cereal várias vezes ao ano (FAO, 1995).

Em 1753, Linnaeus descreveu no seu *Species plantarum* três espécies de sorgo: *Holcus sorghum*, *Holcus saccharatus* e *Holcus bicolor*. Em 1794, Moench distinguiu o género *Sorghum* do género *Holcus*. Em 1805, Person propôs o nome de *Sorghum vulgare* para o *Holcus sorghum* (L.) e em 1961 Clayton propôs o nome de *Sorghum bicolor* (L.) Moench como o nome correcto para o sorgo cultivado. Em 1972 Harlan e Wet publicaram uma classificação simplificada do sorgo. Esta classificação confirmou-se com uma amostragem de 10000 espigas. De acordo com a anterior classificação as espécies de sorgo cultivadas foram distribuídas por 5 grupos: *bicolor*, *guiné*, *caudatum*, *kafir* e *durra* (FAO, 1995).

Posteriormente, o estudo do polimorfismo de 11 enzimas presentes em diferentes variedades de sorgo permitiu separar este cereal em 3 grupos enzimáticos; o primeiro grupo inclui as variedades da África ocidental, o segundo inclui as cinco variedades da África austral e o terceiro as variedades *caudatum* e *durra* da África central e oriental (Ollitrault, *et al.* 1989).

5. ORIGENS E PRODUÇÃO ACTUAL

A origem geográfica do sorgo parece ter sido na Etiópia e por volta do ano 200 d.C. passou a encontrar-se também na África oriental. Daqui foi para a África austral, transportado por um povo que utilizava o grão de sorgo para produção de cerveja.

O sorgo foi levado da África à Índia, provavelmente, durante o primeiro milénio a.C.. Há provas da sua existência, na Índia, no ano 1000 a.C.. Foi, talvez transportado em barcos, da África para a Índia durante cerca de três mil anos. A sua difusão para a China e sudoeste asiático ocorreu por volta do início da era cristã, ou talvez mais cedo, através da rota do comércio das sedas.

Em meados do século XIX chegou à América uma variedade de sorgo: “milho da Guiné”. Esta variedade, proveniente da África ocidental era transportada nos barcos dos comerciantes de escravos. No entanto, aí, o seu cultivo não teve importância até ao século XX (FAO, 1995).

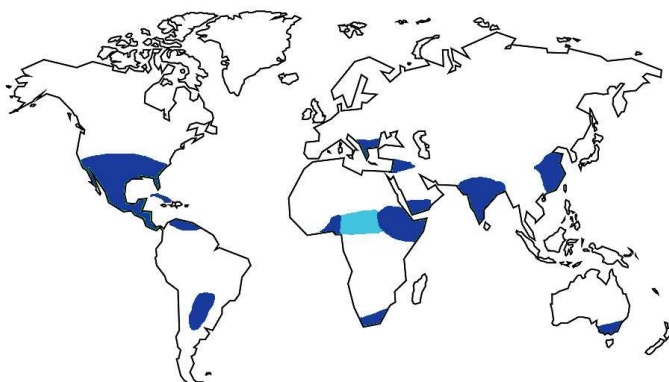


Fig. 1 - Produção de sorgo a nível mundial. A azul escuro estão assinalados os países produtores e a azul claro os países de origem.

Desde o início dos anos setenta até 1979-1981 a produção mundial de sorgo cresceu de 40 milhões para 66 milhões de toneladas. Um estudo da FAO, de 1991, revelou que a produção mundial de sorgo em 1990 foi de 58 milhões de toneladas. Este valor representa um decréscimo de 2 milhões de toneladas em relação à produção do ano de 1989 e um decréscimo de 4 toneladas em relação ao ano de 1988 (FAO, 1995). Dos cinco países produtores de sorgo são os Estados Unidos que detêm a maior parcela, 25 %; a Índia produz 21,5 %, o México 11 %, a China 9% e a Nigéria 7 %. Estes cinco países representam 73 % da produção mundial de sorgo. Contrariamente, oitenta por cento da superfície mundial dedicada à produção de sorgo está localizada em países subdesenvolvidos de África. Aqui, o sorgo é semeado desde o Atlântico até à Etiópia e Somália, sendo esta faixa limitada a norte pelo deserto do Saara e a sul pela floresta equatorial. A América do Norte e a América Central contribuem para uma produção de 37 %, em relação à produção mundial. Na América Central e na América do Sul as zonas produtoras de sorgo correspondem às zonas mais áridas, como é o caso de certas zonas do México, El Salvador, Guatemala, Nicarágua e Argentina. Na América do Norte as zonas produtoras de sorgo apresentam as mesmas características das anteriores. A maior produção do referido cereal corresponde aos estados centrais e meridionais dos Estados Unidos: Kansas, Texas, Nebraska e Arkansas. Estes estados correspondem a 80 % da produção de sorgo dos Estados Unidos. No continente Asiático o sorgo é extensamente cultivado na Índia, China, Paquistão e Tailândia. A produção de sorgo nos países da Europa está limitada a zonas restritas de França, Itália e Espanha. Na Oceânia, a Austrália é o único país produtor, concentrando-se a produção em Queensland e a norte de Nova Gales do Sul (FAO, 1995).

6. CARACTERÍSTICAS DA PLANTA E DO GRÃO

O sorgo, como qualquer cereal de estação quente, é favorecido por temperaturas nocturnas e diurnas elevadas, sendo intolerante a temperaturas baixas. O tempo entre a sementeira e a maturação do grão é de 110-140 dias. A planta adulta pode atingir 75-127 cm, o que facilita a sua colheita mecânica. A planta de sorgo apresenta um sistema de raízes fibrosas que podem penetrar 150-250 cm no solo. As folhas, 14 a 18 em número,

aparecem em posições alternadas do caule. Em alguns casos é possível o aparecimento de rebentos na junção entre as folhas e o caule. A maioria das plantas apresenta até 2 rebentos que maturam 1 a 5 dias depois do panícula principal.



Fig. 2 - Planta de sorgo.

O grão de sorgo pode adquirir diversas tonalidades, desde vermelho a cinzento, passando por amarelo pálido até ao cinzento púrpureo. As cores mais comuns são o branco, bronze e cinzento. Os grãos são, geralmente, esféricos mas podem variar, quer de dimensão quer de forma. O peso de 1000 grãos de sorgo pode variar muito, desde 3 a 80 grama, mas na maioria das variedades 1000 grãos pesam de 25 a 30 grama (FAO, 1995).

7. ESTRUTURA DO GRÃO DE SORGO

A estrutura básica do grão de sorgo é análoga nas várias espécies. Os seus elementos principais são o pericarpo, o gérmen, o embrião e o endosperma. A distribuição relativas dos vários constituintes anatómicos do grão varia de variedade para variedade. Num grão de sorgo o peso médio do pericarpo é de 6 %, do endosperma é de 84 % e do gérmen 10 % (Hubbard, *et al.* 1950). A proporção entre endosperma e gérmen, nos grãos de sorgo é, aproximadamente de 8,4:1.

O pericarpo é o elemento mais externo do grão, é constituído por três camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo divide-se em epiderme e hipoderme.

A epiderme é constituída por células grossas, alargadas e rectangulares que apresentam um revestimento cutínico na superfície exterior. Na epiderme estão, frequentemente, presentes pigmentos. A hipoderme é constituída por células ligeiramente mais pequenas que a epiderme e pode apresentar até três camadas celulares.

O mesocarpo é a camada mais espessa do pericarpo, no entanto esta varia bastante com o genotipo. Do conjunto de todos os cereais o sorgo é o único que apresenta mesocarpo com pequenos grânulos de amido (1-4 μm). Nenhum outro cereal apresenta amido no pericarpo.

O endocarpo é a zona mais interna do pericarpo. É constituída por células transversais e por uma camada de células tubulares responsáveis pelo transporte de humidade ao grão.

Imediatamente abaixo do pericarpo está localizada a testa. Nalgumas variedades esta camada é bastante pigmentada, ou seja, apresenta elevada percentagem de taninos condensados (Hoseney *et al.*, 1981). A coloração e o tipo de pigmento são uma característica genética. A espessura desta camada não é uniforme; é mais delgada na zona onde está localizado o embrião e mais espessa na zona diametralmente oposta.

O endosperma é o constituinte mais abundante do grão. É um importante tecido de armazenamento, constituído por uma camada aleurona e por outras camadas mais internas; uma de textura córnea e outra de textura amilácea. Em todas as variedades de sorgo a aleurona é constituída por uma única camada que está localizada imediatamente abaixo do revestimento da semente (testa). As células da aleurona são ricas em minerais, vitamina B, lípidos e contêm, também, hidrolases (Fig. 3).

O endosperma periférico é constituído por células rectangulares largas e dispostas de forma muito compacta. Apresenta grânulos de amido e substâncias proteicas, dentro de uma matriz proteica (Hoseney *et al.*, 1987). O amido presente nesta zona não está facilmente disponível para ataque enzimático, a não ser que a matriz proteica seja previamente degradada (Chandrasekher e Kirleis, 1988).

A matriz proteica é constituída por glutelinas (Sekinger e Wolf, 1973) e os corpos proteicos por prolaminas (Hoseney *et al.*, 1974); estas duas variedades de proteínas constituem a maior percentagem de proteínas do grão.

Os corpos proteicos presentes no endosperma de sorgo apresentam forma esférica e dimensões variáveis (2-3 μm) (Adams e Novellie, 1975). A variação das dimensões ocorre

consoante a variedade de sorgo e inclusivamente dentro do endosperma do próprio grão, as dimensões dos corpos proteicos podem ser variáveis. No sorgo, desde a periferia até ao interior da semente, onde está localizado o endosperma amiláceo, o número de corpos proteicos diminui, ao mesmo tempo que a percentagem de amido aumenta.

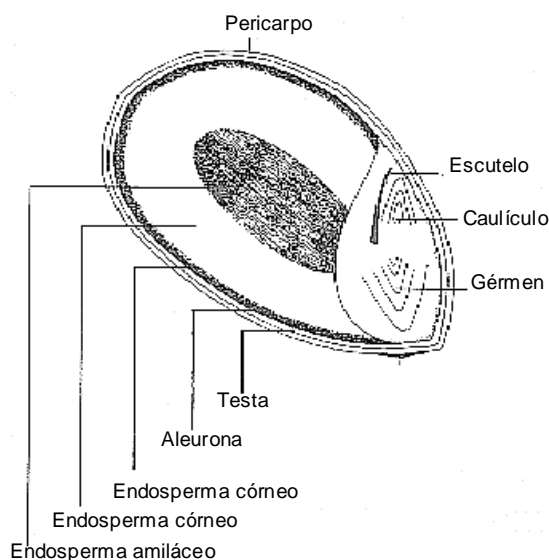


Fig. 3 - Esquema de um grão de sorgo.

Os grânulos de amido do endosperma córneo apresentam uma forma poliédrica e o seu tamanho varia consoante a variedade. No endosperma amiláceo os grânulos de amido apresentam uma forma esférica e de tamanho superior aos do endosperma córneo (Hoseney *et al.*, 1987). O amido desta região está mais sujeito a degradação enzimática (Sullins e Rooney, 1977).

A proporção entre endosperma córneo e amiláceo determina a textura do grão de amido. Nos grão de textura mais mole o endosperma mais abundante é o endosperma amiláceo. A textura do grão é um dos parâmetros mais importantes e que determina a qualidade alimentar do grão de sorgo.

Quando o endosperma apresenta a cor amarela, significa que a espécie apresenta grande teor de carotenos e xantofilas. Nestes casos o valor nutritivo dos cereais é superior (Hoseney *et al.*, 1987).

O gérmen é constituído pelo caulículo e pelo escutelo. O escutelo é um tecido de armazenamento rico em lípidos, proteínas, enzimas e minerais. Os lípidos presentes no

gérmen de sorgo apresentam elevados teores em ácidos gordos poli-insaturados e é muito semelhante aos lípidos presentes no milho (FAO, 1995).

8. AS PROTEÍNAS DO SORGO

O conteúdo e composição proteicas dos grãos de sorgo variam com vários factores, de entre os quais: genotipo, disponibilidade de água, fertilidade do solo, temperatura e condições ambientais durante o desenvolvimento do grão (Serena-Saldivar e Rooney, 1995).

A primeira publicação que refere a extracção sequencial de proteínas de cereais data de 1914. Nessa publicação Osborne e Mendel referem que com extracções sequenciais com água, solução salina, álcool e solução alcalina, conseguem-se extrair albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas, respectivamente. Este método apresenta algumas falhas, uma vez que algumas proteínas formam aglomerados insolúveis ou que são solúveis em mais que um solvente. Landry e Moureaux (1970) modificaram o método de extracção de Osborne e Mendel incorporando um passo de extracção com soluções alcoólicas na presença de agente redutor, entre a extracção com solução alcoólica e a extracção com solução alcalina.

Os processos de extracção sequencial são complexos, uma vez que as proteínas têm tendência a aglomerar, as prolaminas, por exemplo, apresentam elevada tendência a estabelecerem ligações fortes com as glutelinas.

Taylor *et al.* (1984) desenvolveram um método de extracção sequencial de proteínas baseado na extracção sequencial de Landry e Moureaux (1970), mas com algumas alterações que permitem a obtenção de melhores rendimentos de extractibilidade proteica. De entre as modificações pode salientar-se a concentração de NaCl, para extracção de albuminas e globulinas, passou a ser de 1,25 M. A extracção de prolaminas totais (prolaminas 1 e prolaminas 2) passou a ser efectuada com solução de *terc*-butanol 60 % e 0,05 % de DTT.

Wallace *et al.* (1990) desenvolveram um novo método de extracção de proteínas de cereais. Neste método todas as proteínas do endosperma são solubilizadas num tampão borato, de pH elevado, com SDS e 2-mercaptoetanol. Posteriormente, as proteínas em solução são divididas em solúveis em álcool e insolúveis em álcool. Esta divisão é

conseguida adicionando etanol até uma concentração de 60 %. A fracção de proteínas insolúveis em álcool é constituída por uma mistura de albuminas, globulinas e glutelinas. Em 1995, Hamaker e colaboradores aplicaram o método desenvolvido por Wallace *et al.* (1990) para a quantificação de proteínas de sorgo, prolaminas e outro tipo de proteínas, e para comparação com o método de Landry e Moureaux (1970). Concluíram que com este tipo de extracção consegue-se uma melhor recuperação de prolaminas e ao mesmo tempo, ter numa só fracção todas as proteínas do endosperma.

De acordo com diferenças de solubilidade as prolaminas podem ser subdivididas em duas fracções. Uma das fracções pode ser extraída com soluções alcoólicas. Esta fracção é denominada prolaminas verdadeiras ou prolaminas 1. A outra fracção é extraída por soluções alcoólicas mas apenas na presença de agentes redutores. Esta fracção é denominada por prolaminas 2 (Mazhar *et al.*, 1993), ou prolaminas entre-cruzadas (Guragossian *et al.*, 1978; Taylor *et al.*, 1984 e Oria *et al.*, 1995) ou ainda, glutelinas solúveis em álcool (Jambunathan *et al.*; 1975 e Sastry *et al.*, 1986).

A literatura sugere que a diferença de extractibilidade destas duas fracções reside no facto das prolaminas 1 (extraídas com soluções alcoólicas) estarem no grão na forma de polipéptidos simples, enquanto que as prolaminas 2 (extraídas com soluções alcoólicas na presença de agente redutor) estão presentes no grão na forma de aglomerados de elevado peso molecular constituídos por péptidos ligados por pontes de dissulfeto. Segundo dados bibliográficos, nenhuma diferença se verifica entre estas duas fracções de prolaminas quando são analisadas em condições redutoras (El Nour *et al.*, 1998).

O teor proteico de cada zona do grão de sorgo é, aproximadamente, de 80 % no endosperma, 16 % no gérmen e 3 % no pericarpo (Taylor *et al.*, 1986). O gérmen é rico em albuminas e globulinas, enquanto que o endosperma é rico em kafirinas (as prolaminas de sorgo) e glutelinas (Warsi e Wright, 1973).

No que diz respeito aos teores de cada tipo de proteínas sabe-se que as albuminas constituem entre 2-9 % da proteína total do grão, as glutelinas 12,9-16 %, as prolaminas 27-43,1 % (podendo chegar a atingir valores bem mais elevados) e as glutelinas 26,1 % (Naik 1968).

As prolaminas estão localizadas em corpos proteicos e as glutelinas na matriz proteica envolvente do endosperma amiláceo. Ambas desempenham no grão de cereal a

função de armazenamento de azoto e aminoácidos necessários para a germinação da semente (Warsi e Wright, 1973).

As proteínas de reserva dos cereais são sintetizadas no retículo endoplasmático durante o desenvolvimento do endosperma e vão sendo acumuladas em corpos proteicos, com membrana, na forma de polímeros (Taylor *et al.*, 1985). A formação desses polímeros de elevada massa molecular são, em parte, promovidos pela maturação e secagem da semente (Oria *et al.*, 1995).

Dependendo do peso molecular, extractibilidade e estrutura, e por analogia com as zeínas (prolaminas do milho), a fracção de prolaminas do sorgo pode ser dividida em três fracções distintas: as kafirinas α , kafirinas γ e kafirinas β . As kafirinas α são constituídas pelas kafirinas $\alpha 1$ do peso molecular compreendida entre 24 e 29 kDa e pelas kafirinas $\alpha 2$ de 22 kDa. As kafirinas β apresentam uma massa molecular de 19 kDa e, por sua vez, as kafirinas γ apresentam uma massa molecular de 27 kDa (Mazhar e Chandrashekar, 1993). Shull *et al.*, em 1992, publicaram uma classificação distinta; atribuiu às kafirinas α um peso molecular de 25 e 23 kDa, às kafirinas β um peso molecular de 16, 18 e 20 kDa e às kafirinas γ um peso molecular de 28 kDa.

No que diz respeito à distribuição destas kafirinas nos corpos proteicos, Shull *et al.* (1991) detectaram, por microscópica electrónica de transmissão, zonas dos corpos proteicos mais escuras e outras zonas mais claras; por microscopia imunolectrónica determinaram que as regiões mais claras centrais corresponderiam à presença de kafirina α enquanto que zonas mais escuras na periferia do corpo proteico corresponderiam à presença de kafirina β e γ . Foram, também detectadas regiões escuras que surgem como inclusões no corpo proteico, essas inclusões foram atribuídas à presença de kafirina γ .

Os mesmos autores determinaram que os corpos proteicos mais periféricos apresentam maior percentagem em kafirinas α do que os corpos proteicos centrais que apresentam mais teor em kafirinas β e γ .

Quando as fracções de prolaminas 1 e 2 são analisadas por electroforese em condições redutoras nota-se, em ambas, a presença das kafirinas α , γ , β , embora em diferentes proporções (Mazhar e Chandrashekar, 1993; Sastry *et al.*, 1986 e Taylor *et al.*, 1984 b). Quando analisadas em condições não redutoras para além destes monómeros

estão, também, presentes oligómeros de diferentes pesos moleculares. Estes oligómeros são constituídos pelas kafirinas α e γ que estabelecem ligações S-S, as kafirinas β estão presentes apenas na composição dos polímeros de elevado peso molecular servindo como pontes de ligação dos restantes oligómeros (El Nour *et al.*, 1998).

8.1. Composição em aminoácidos das prolaminas

Em relação à composição em aminoácidos destes três tipos de kafirinas pode referir-se que o teor de aminoácidos com enxofre é bastante diferente entre elas. As kafirinas α , por exemplo, contêm baixo teor em cisteína, aproximadamente 1,1 % (mole), enquanto que as kafirinas β e γ apresentam um teor invulgarmente elevado de grupos SH (Shull *et al.*, 1992). Segundo Barros *et al.*, em 1991, o gene associado à kafirina γ revela a existência de 14 resíduos de cisteína por molécula. As kafirinas α apresentam elevada percentagem de aminoácidos hidrofóbicos, tais como fenilalanina, leucina e isoleucina. Este tipo de kafirinas podem, então, ser extraídas preferencialmente com quantidades relativamente elevadas de álcool. As kafirinas β apresentam na sua composição pequena quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, no entanto apresentam elevada percentagem em aminoácidos hidrofílicos, tais como glicina e são também ricas em metionina. As kafirinas γ , tal como as kafirinas β , apresentam características mais hidrofílicas, por serem ricas em glicina e histidina (Tab. 1).

A fracção de prolaminas é deficiente em lisina e triptofano. Estes dois aminoácidos são, então, os limitantes no sorgo, uma vez que as prolaminas são a fracção proteica mais abundante deste cereal. Na tentativa de incrementar o valor proteico do sorgo tem-se tentado efectuar modificações genéticas de forma a aumentar a relação gérmen-endosperma (Serena-Saldivar e Rooney, 1995).

Surgem, assim, dois tipos de variedades de sorgo, uma que apresenta endosperma vitreo e outra que apresenta endosperma opaco; esta última variedade é mais rica em albuminas e globulinas do que prolaminas, sendo similar o teor em globulinas.

Tab. 1 - Composição em aminoácidos (mole %) das kafirinas α β e γ , segundo Watterson *et al.* (1993)

Aminoácido	Kafirina α	Kafirina β	Kafirina γ
Asparagina e Ác. Aspartico	5,6	3,3	0,6
Tirosina	3,2	4,6	4,2
Serina	5,8	4,6	5,0
Glutamina e Ác. Glutâmico	21,8	17,7	13,8
Prolina	8,9	9,7	22,6
Glicina	4,1	6,8	8,6
Alanina	15,2	13,4	6,3
Cisteína/2	1,1	4,9	6,9
Valina	4,8	5,2	5,8
Metionina	0,6	5,7	1,0
Isoleucina	4,4	2,3	2,6
Leucina	15,1	12,0	9,0
Tirosina	2,3	3,0	2,1
Fenilalanina	4,0	1,9	1,8
Histidina	1,2	0,9	6,9
Lisina	0,4	0,5	0,4
Arginina	0,8	2,7	2,0

Dentro das prolaminas deste tipo de sorgo são mais abundantes as kafirinas β e γ (Watterson *et al.*, 1993). As prolaminas são, também, pobres em arginina e histidina. Apresentam valores elevados de prolina, ácido glutâmico e leucina (Ahuja *et al.*, 1970).

Têm-se efectuado numerosos estudos que visam encontrar variedades de sorgo e milho ricas em lisina e que apresentem, portanto, maior valor nutritivo (Yau *et al.*, 1999).

8.2. Efeito do tratamento térmico nas prolaminas

Em 1986, Hamaker *et al.* demonstram que o cozimento do sorgo diminui selectivamente a digestibilidade das proteínas; concluíram, com o mesmo estudo, que são as prolaminas a fracção proteica mais afectada com o cozimento uma vez que podem estabelecer numerosas ligações por pontes de S-S intermoleculares. Dentro das prolaminas

parece ser a kafirina α a menos digerível das kafirinas, este facto pode não estar relacionado apenas com a sua natureza química, mas também com a sua acessibilidade, note-se que esta kafirina está localizada no interior do corpo proteico rodeada pelas kafirinas β e γ . Estudos posteriores (Weaver *et al.*, 1998) revelaram que variedades de sorgo com valores superiores de digestibilidade proteica apresentam a kafirina α , nos corpos proteicos, mais acessível ao ataque enzimático.

A presença de proteínas polimerizadas pode estar, também, relacionada com a textura do endosperma, uma vez que a sua rigidez, influência a estrutura dos corpos proteicos dificultando a sua acessibilidade por parte de enzimas (Marzhar *et al.*, 1995).

Indicações de que as proteínas de sorgo apresentam maior percentagem de ligações por pontes de dissulfeto, quando comparadas com proteínas de milho, levaram Axtel *et al.*, em 1981, a sugerir que a formação dessas ligações poderá estar na base da baixa digestibilidade das proteínas de sorgo.

Quando são efectuados ensaios de digestibilidade em farinha de sorgo crua verifica-se que no resíduo estão presentes 31 % de kafirina α , 15,3 % de kafirina β e 13,5 % de kafirina γ . Este estudo foi acompanhado por microscópica electrónica de transmissão. Com o auxílio desta técnica verificou-se que a digestão dos corpos proteicos é iniciada na periferia, ou seja, é iniciada na kafirinas β e γ . Quando o mesmo tipo de ensaios são repetidos com amostras tratadas com agente redutor (bissulfito de sódio) a quantidade de prolaminas que permanece no resíduo, após digestão, é reduzida significativamente. Para além disso os corpos proteicos são muito mais degradados. Quando se repetem os ensaios de digestibilidade em amostras de farinha cozida, aumenta a quantidade de kafirinas no resíduo e os corpos proteicos parecem não ser alterados com a digestão. Caso se trate a amostra de farinha cozida com agente redutor o processo é parcialmente revertido: a quantidade de kafirinas residuais diminuem e os corpos proteicos deixam de ser tão resistentes à digestão. Portanto, a baixa digestibilidade das prolaminas parece estar relacionada com a presença de pontes de dissulfeto estabelecidas entre peptídeos, principalmente entre kafirinas β e γ (Oria *et al.*, 1995). Já em 1992 Rom, *et al.*, em estudos de digestibilidade efectuados sem localização prévia das diferentes kafirinas no grão, detectaram por microscópica electrónica de transmissão, o aparecimento de irregularidades ('pitts') na periferia do corpo proteico quando a amostra de farinha era tratada com agente redutor. Essas irregularidades não eram perceptíveis quando se tratava de corpos proteicos

referentes a amostras de farinha cozida, nem tão pouco em amostras de farinhas sem qualquer tipo de tratamento redutor. Quando a amostra cozida era tratada com agente redutor, as referidas irregularidades voltavam a aparecer. Estes factos foram atribuídos à formação de pontes dissulfeto aquando do cozimento.

Estes estudos confirmaram as suposições de Hamaker *et al.* (1987): o facto da digestibilidade do sorgo diminuir aquando do cozimento, sugere que o seu cozimento em água parece estar relacionada com a formação de aglomerados de proteína de elevado peso molecular ligados por pontes de dissulfeto. Este estudo de digestibilidade *in vitro* mostrou ainda que o uso de agentes redutores, responsáveis pela clivagem das referidas ligações, aumenta, de facto, a digestibilidade das proteínas de sorgo cozinhado, contudo os valores encontrados não chegaram a atingir os valores de digestibilidade de outros cereais, nem sequer do sorgo cru (Hamaker *et al.*, 1987).

Desta forma, parecem existir, de facto, outros factores, para além da formação de pontes dissulfeto, que influenciam os valores de digestibilidade das proteínas de sorgo.

9. A PRESENÇA DE POLIFENOIS NO SORGO

O sorgo é um dos poucos cereais capazes de produzir quantidades relativamente elevados de compostos polifenólicos poliméricos, vulgarmente conhecidos como taninos (Elkin *et al.*, 1996).

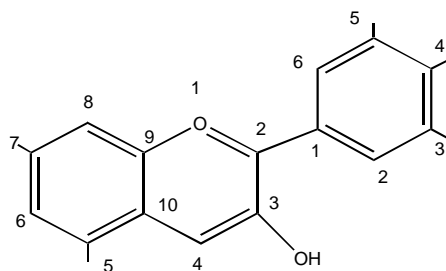


Fig. 4 - Estrutura molecular de 3-flavenol.

O termo polifenol é usado para caracterizar compostos que apresentam sistemas aromáticos com mais de um grupo hidroxilo. Os polifenóis extraídos do sorgo podem ser divididos em três fracções: polifenóis não tanínicos com baixos pesos moleculares

(derivados de ácidos fenólicos) que se podem encontrar, quer livres quer esterificados nas camadas mais periféricas do grão; proantocianidinas, de estrutura C6-C3-C6, com valores de pesos moleculares compreendidos entre 2 e 10 kDa (flavonoides) e polímeros que apresentam pesos moleculares relativamente elevados, por volta de 10 e 50 kDa (taninos). Os taninos podem estar presentes na forma de taninos condensados ou como taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados (proantocianidinas) não podem ser hidrolisados por enzimas e são, geralmente associados à pigmentação da testa. Os hidrolisáveis estão presentes no grão em quantidades muito baixas e apresentam na sua composição moléculas de açúcar ou ácido fenocarboxílico (Grimmer *et al.*, 1992).

Foi reconhecido que os taninos (proantocianidinas, oligómeros de flavano-3-ol) quando presentes no sorgo reduzem o valor nutricional do grão (Price *et al.*, 1979 b).

Quando os taninos estão presentes na dieta de animais, para além de outros problemas que possam surgir, estes não ganham peso com tanta facilidade ou, se for esse o caso, a sua taxa de crescimento distancia-se dos padrões normais (Price *et al.*, 1979 a).

A adstringência sentida quando são ingeridos alimentos com elevado teor em taninos está relacionada com o facto da capacidade destes compostos estabelecerem ligações com as proteínas; esta sensação é causada devido à precipitação das proteínas na saliva e nas mucosas. É interessante verificar que repelência das aves a algumas variedades de sorgos está relacionada com esta característica dos seus taninos (Bullard *et al.*, 1981).

As variedades de sorgo ricas em taninos são de grande importância em certas regiões nas quais o efeito depredatório das aves é relevante. A presença de taninos está, também, associada ao facto das variedades de sorgo ricas em taninos serem menos susceptíveis à germinação pré-colheita (Price *et al.*, 1979 b).

É também notória a resistência a bolores apresentada por algumas variedades de sorgo, a qual parece estar relacionada com a presença de elevadas quantidades de flavano-4-ol. Os níveis de leucoantocianidinas é duas a três vezes superior em variedades de sorgo que apresentem resistência a bolores (Jambunathan *et al.*, 1986).

O efeito negativo dos taninos pode estar relacionado com o facto dessas substâncias apresentarem uma elevada tendência para estabelecerem ligações com as proteínas. Os complexos formados entre proteínas e taninos não são facilmente digeridos por estômagos monogástricos o que está associado a valores baixos de digestibilidade proteica assim

como a reduzidos aumentos de peso por parte dos consumidores (Featherston e Rogler, 1975).

O significativo efeito antinutricional que os polifenóis apresentam, não advém, apenas, da sua tendência para estabelecer ligações com proteínas mas também do facto destes compostos inibirem as enzimas digestivas (nomeadamente com a α -amilase); interferem, portanto, tanto na digestão como na absorção intestinal (Hulse, 1980).

Os taninos são, também, responsáveis pela inibição de reacções enzimáticas e de actividade microbiana necessárias ao fabrico da cerveja (Watson e Novellie, 1975).

Em 1963 Goldstain e Swain referiram que a capacidade dos taninos no estabelecimento de ligações fortes com as proteínas está intimamente relacionada tanto com a natureza química da molécula bem como com as suas dimensões e estrutura. Segundo Butler (1982) se as moléculas de taninos apresentarem menos de três unidades de flavano são demasiado pequenas para estabelecerem ligação com proteínas, por outro lado, se as moléculas apresentem um grau de polimerização elevado (com mais de 10 unidades de flavano) são insolúveis, apresentando poucos locais reactivos e são demasiado grandes para adquirirem a orientação necessária na participação em reacções de polimerização de proteínas. A diminuição da adstringência do grão, durante o desenvolvimento deste, pode ser devida ao facto de ocorrer polimerização dos monómeros de flavano aquando da maturação (Bullard *et al.*, 1981). Pode ainda estar relacionado com a presença de oligómeros pequenos assim como de outras substâncias não tanínicas no grão de sorgo imaturo (Butler, 1982).

A natureza da interacção entre taninos e proteínas foi sugerida por Van-Burns e Robinson (1969) como sendo estabelecida por pontes de hidrogénio entre o grupo fenílico da molécula de taninos e o oxigénio da ligação ceto-imida da proteína. Hagerman e Butler (1989) sugeriram que a referida ligação é de natureza hidrofóbica. Haslam referiu, em 1989, que as proteínas estabelecem ligações com taninos quer por ligações covalentes quer por ligações iónicas.

Como foi anteriormente referido os taninos apresentam elevada afinidade para estabelecerem ligação com as proteínas. No sorgo cerca de 68 % dos taninos totais estão presentes nas fracções proteicas. A fracção de prolaminas é que apresenta maior teor nestes compostos, podendo apresentar cerca de 30,5 % do total de taninos (Chavan *et al.*, 1989).

Para determinar o teor em polifenóis do sorgo foram aplicados vários procedimentos. De entre os quais pode salientar-se o método da vanilina. Este método, sensível a flavonoides ou dihidrocalconas que apresentem uma ligação simples na posição 2,3 e uma posição meta livre, sob orientação de grupos hidroxilo, no anel B, é muito utilizado para se efectuarem determinações quantitativas dos taninos condensados do grão (Price *et al.*, 1979 a).

Em contraste, os métodos redox, como é o caso do método de Folin-Denis ou o método de azul de Prússia detectam a presença de quaisquer polifenóis (Price *et al.*, 1979 a).

Até ao momento, não há conhecimento quanto à formação localizada dos complexos entre proteínas e polifenóis; isto é, se esses complexos existem *in situ* ou se são formados apenas aquando da extracção (Chavan *et al.*, 1989).

10. CONSIDERAÇÕES SOBRE INTERACÇÕES DE PROTEÍNAS

A estrutura primária de uma proteína corresponde à ordem sequencial dos resíduos de aminoácidos que estabelecem ligações covalentes (ligações peptídicas).

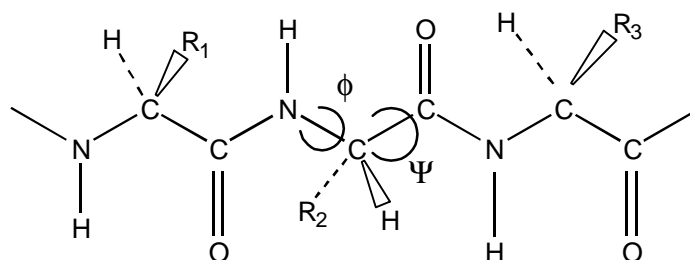


Fig. 5 - Estrutura de um fragmento de uma cadeia polipeptídica, em conformação *trans* ϕ e ψ representam os ângulos de rotação em torno do C α . R₁, R₂ e R₃ estão em posição *trans*.

A ligação que é estabelecida entre aminoácidos é uma ligação amida substituída, estabilizada por ressonância. A ligação C-N apresenta um carácter parcial de ligação dupla (~ 40 %) e a ligação C=O apresenta um carácter parcial de ligação simples (~ 40 %). Esta característica da ligação peptídica confere-lhe propriedades peculiares: o grupo -N-H não se protona numa gama de pH de 0 a 14 e a ligação -C-N- não roda livremente. Os quatro átomos envolvidos na ligação peptídica e os dois átomos C α estão localizados no mesmo

plano. Como consequência da estabilização por ressonância, os átomos O e H do grupo CO-NH estão em planos diferentes, são portanto *trans*. As ligações covalentes simples estabelecidas entre os átomos de C α são as únicas que apresentam capacidade de rotação (Fig. 5).

No que diz respeito ao arranjo espacial adoptado pela cadeia peptídica, ou seja, à estrutura secundária das proteínas, os átomos de carbono α rodam em torno dos eixos formados por ligações covalentes simples, existem portanto numerosas hipóteses de conformação. Em condições normais (a determinado valor de pH e temperatura) cada cadeia polipeptídica possui uma conformação nativa. Termodinamicamente essa conformação corresponde à conformação de menor energia livre (ΔG) ou seja, é a conformação mais estável. Essa conformação mais estável depende da polaridade, hidrofobicidade e impedimento estérico das cadeias laterais dos aminoácidos. As estruturas mais frequentes são as hélices α , $\alpha\pi$, γ e 3_{10} , estruturas β , folhas plissadas e curvas β , de entre outras.

No que diz respeito às hélices α elas apresentam 3 a 6 resíduos por volta, cada volta apresenta um diâmetro aproximadamente 0,6 nm, as cadeias laterais dos aminoácidos estão localizadas para o exterior da hélice. Este tipo de estrutura é estabilizado por pontes de H estabelecidas entre -NH-CO- e o O mais próximo da ligação peptídica, localizado na volta imediatamente anterior. Uma vez que cada ligação peptídica está estabilizada por uma ponte de H, formam-se assim dipolos eléctricos, todos com a mesma orientação, que conferem grande estabilidade à estrutura proteica. A presença de prolina na proteína interrompe a estrutura em hélices α . Quando a proteína apresenta aminoácidos com a cadeia lateral volumosa, como é o caso da isoleucina, a estrutura em hélice é interrompida surgindo uma região com uma conformação desordenada, vulgarmente designada por “random coil”.

As hélices 3_{10} são estruturas presentes em certas proteínas globulares, apresentam 3 aminoácidos por volta de hélice. As hélices π e γ possuem, respectivamente, 4,4 e 5,2 resíduos por volta.

As estruturas helicoidais de poliprolina I e poliprolina II são estruturas adquiridas por proteínas ricas em prolina, ambas têm capacidade de interconversão, sendo a estrutura II a mais estável em meio aquoso. A estrutura de poliprolina I está orientada para a esquerda, apresenta 3,3 resíduos por volta e a ligação peptídica apresenta a conformação *cis*, a

estrutura de poliprolina II apresenta, de igual forma, orientação para a esquerda, no entanto cada volta apresenta 3 resíduos e a ligação peptídica apresenta a conformação trans.

A estrutura β é uma estrutura em zig-zag mais esticada que a hélice α . Pode ocorrer transição entre hélice α e estrutura β por quebra das pontes H-H intramoleculares; um tratamento térmico pode estar na base desta transformação. Quando a proteína fica mais estendida verifica-se a existência de ligações intermoleculares que conduzem à formação de folhas pregueadas, todas as ligações peptídicas da proteína intervêm na sua formação. Este tipo de estrutura pode apresentar orientação paralela ou antiparalela. Os grupos laterais dos aminoácidos podem estar localizados acima ou abaixo do plano formado pelas folhas plissadas. A carga e o impedimento estérico destes grupos não são entrave ao estabelecimento deste tipo de conformação, no entanto, os aminoácidos: asparagina, glutamina, histidina, lisina, prolina e serina não podem integrar este tipo de estrutura.

As curvas β evitam que as cadeias polipeptídicas se repelam, apresentando uma conformação angular estabilizada por pontes de H.

A organização tridimensional de um polipeptídeo que apresente já estruturas secundárias bem definidas (hélice α , curvas β , folhas plissadas β e regiões de estrutura secundária mal definida, como é o caso da estrutura secundária “random coil”) é denominada de estrutura terciária. A maioria das proteínas globulares conhecidas são solúveis em água, neste tipo de proteínas, os resíduos polares estão localizados no exterior da estrutura tridimensional, enquanto que os resíduos hidrofóbicos estão localizados no interior. Podem encontrar-se exceções; em alguns casos pode gerar-se uma distribuição anisotrópica de cargas elétricas conferindo à proteína funções biológicas específicas (é o caso das proteinases).

No caso de proteínas insolúveis em água e solúveis noutro tipo de solventes, como por exemplo, solventes orgânicos, grande percentagem de aminoácidos hidrofóbicos encontra-se na superfície da molécula. No interior da estrutura proteica são estabelecidas numerosas pontes de H que contribuem para a sua estabilização.

A estrutura quaternária das proteínas surge como resultado de associações não covalentes de unidades proteicas. O arranjo final não é obrigatoriamente simétrico. As forças ou ligações que estabilizam as estruturas quaternárias são as mesmas que estabilizam as estruturas secundárias e terciárias, com excepção das pontes de dissulfeto.

De entre as interacções que estabilizam as proteínas podem salientar-se: impedimentos estéreos, interacções de Van der Waals, interacções electrostáticas, ligações por pontes de H, interacções hidrofóbicas e ligações covalentes por pontes de dissulfeto.

No que diz respeito aos impedimentos estéreos, a ligação peptídica possui uma liberdade de rotação que, na ausência de impedimentos estéreos, permite aos ângulos ϕ e ψ valores entre 180° e -180° . No entanto, com a maioria dos grupos laterais dos aminoácidos certos ângulos são impossíveis.

As interacções de Van der Waals são fracas ($1-9 \text{ kJ / mol}$), quando comparadas com outro tipo de ligações. O tipo de interacção, repulsão ou atracção, depende da distância entre os átomos e, no caso das proteínas, dos ângulos de torção (ϕ e ψ) em torno dos átomos de carbono α . A uma grande distância as interacções são inexistentes; à medida que a distância diminui, surge uma força atractiva e quando a referida distância diminui ainda mais começa a surgir uma força repulsiva. As forças atractivas de Van der Waals estabelecidas entre átomos compreendem as interacções dipolo-dipolo (a ligação peptídica e a serina são dipolos), estas induzem as forças de dispersão de London.

Considerando as proteínas como polielectrólitos, devido à presença de grupos ionizáveis de certas cadeias laterais de aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, tirosina, lisina, histidina, arginina e cisteína) e dos resíduos terminais C e N, pode considerar-se a existência de interacções electrostáticas. Os grupos α -aminados e α -carboxílicos envolvidos na ligação peptídica participam, apenas numa pequena percentagem para as propriedades iónicas das proteínas. A ionização de um determinado grupo é influenciada pela proximidade de outros grupos ionizáveis, pelos resíduos hidrofóbicos e ainda pelas ligações H. Os valores de pK_a dos grupos ionizáveis das cadeias laterais dos aminoácidos podem variar de acordo com o ambiente no qual estão inseridos. Em solução aquosa a maioria dos grupos ionizáveis estão localizados na superfície da proteína.

Os grupos ionizáveis das proteínas originam forças atractivas e repulsivas que contribuem para estabilizar quer a estrutura secundária quer terciária. Por exemplo, os grupos carboxílicos β e γ da asparagina e glutamina e o grupo carboxílico do aminoácido do terminal C possuem, frequentemente, cargas negativas. Os grupos ϵ -amínico da lisina e o grupo α -amínico do aminoácido do terminal N, o grupo imidazol da histidina e o grupo

guanidilo da arginina possuem frequentemente carga positiva. Nas interações electrostáticas estão envolvidas energias da ordem dos 42 a 84 kJ / mol.

As interações proteína – iões servem para estabilizar a estrutura quaternária das proteínas. As interações electrostáticas do tipo proteína - Ca^{2+} , contribuem, por exemplo, para estabilizar as micelas de caseína. Noutros casos a interacção de proteínas com iões está relacionada com a actividade biológica de transporte de iões ou com actividade enzimática. De um modo geral, o ião liga-se à proteína num local bem definido e várias cadeias laterais de aminoácidos podem estar envolvidos na referida ligação. Os iões dos metais de transição podem estar simultaneamente ligados aos grupos imidazol e tiol por ligações iónicas parciais.

As ligações por pontes de hidrogénio são estabelecidas entre um átomo electronegativo que possua, pelo menos, um duplete de electrões desemparelhados e um átomo de H que esteja ligado, covalentemente, a um átomo electronegativo. Nas proteínas este tipo de ligações pode ser estabelecida entre o oxigénio de um grupo carbonilo de uma ligação peptídica e um H do grupo $-\text{NH}$ de uma outra ligação peptídica. A distância de ligação de hidrogénio $\text{O}\cdots\text{H}$ é de cerca de 1,75 Å e a energia dessa ligação pode variar entre 8 e 40 kJ / mol.

Este tipo de ligação desempenha um papel fundamental na estabilização das estruturas secundárias da proteína e serve também para estabilizar a sua estrutura terciária. Os grupos polares dos aminoácidos localizados na superfície das proteínas podem estabelecer um grande número de ligações por pontes de H com moléculas de água, contribuindo assim para a estrutura específica e a solubilidade de certas proteínas.

A estrutura nativa das proteínas depende do solvente no qual elas se encontram. A hidrofobicidade das cadeias laterais de aminoácidos é devida à sua natureza química apolar, este tipo de resíduos não sofrem interações de Van der Waals e não interagem com moléculas polares, como é o caso da água. Têm, sim, tendência a estabelecer ligações hidrofóbicas com outras regiões hidrofóbicas das proteínas.

O estabelecimento de ligações covalentes entre resíduos de cisteína limita o número de estruturas proteicas possíveis e contribui para a estabilização da molécula proteica. Assim, moléculas de proteína que possuam 5 a 7 pontes de dissulfeto por cem aminoácidos são particularmente estáveis. São proteínas que apresentam estruturas particularmente resistentes em condições que desnaturariam a maior parte das proteínas (valores extremos

de pH, temperaturas elevada, etc.). Algumas proteínas possuem, simultaneamente, resíduos de cisteína e de cistina, podendo sofrer reacções que envolvem rearranjo das ligações S-S existentes (Cheftel, *et al.* 1985).

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

"Name the greatest of all inventors. Accident."
Mark Twain

1. AMOSTRAS
2. FRACCIONAMENTO PROTEICO
3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA
 - 3.1 Separação electroforética
 - 3.2. Revelação de proteínas
 - 3.3. SDS-PAGE Semi-Preparativa
4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)
5. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283
6. CROMATOGRAFIA DE COLUNA
 - 6.1. Cromatografia de exclusão molecular de baixa pressão
 - 6.2. HPLC
7. FTIR
8. RMN

1. AMOSTRAS

As amostras de farinha de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] NK283 e Kenian Local White usadas neste estudo foram recebidas da Universidade de Pretória.

As amostras de prolaminas e glutelinas foram fraccionadas no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. O comportamento electroforético da fracção de prolaminas foi comparado com o das amostras de prolaminas recebidas, já fraccionadas, da Universidade de Pretória, África do Sul. Verificou-se que os dois lotes de amostras são semelhantes.

2. FRACCIÓNAMENTO PROTEICO

As prolaminas 1, prolaminas 2 e glutelinas foram fraccionadas a partir de farinha decorticada e de farinha decorticada cozida em água de acordo com uma modificação ao método de fraccionamento de proteínas desenvolvido por Taylor *et al.* (1984 b).

Quinze gramas de cada amostra foram misturadas com 30 mL de NaCl 1M e dialisadas contra a mesma solução, durante dois dias. A membrana de diálise usada apresentava um limite de exclusão de 3 kDa. Após centrifugação, a 15000 rpm durante 15 minutos, obteve-se um sobrenadante com albuminas e globulinas e um resíduo (R₁).

O sobrenadante foi dialisado contra água, até remoção completa do sal, e liofilizado ((A-G)₁). O resíduo (R₁) foi extraído com 30 mL de água, após centrifugação, a 15000 rpm durante 15 minutos, obteve-se um sobrenadante e um resíduo (R₂). Este passo não tem como única finalidade a remoção de NaCl do resíduo anterior, mas também a extracção de algumas proteínas solúveis em solução salina. No sobrenadante estão ainda presentes algumas albuminas e globulinas; segundo Taylor *et al.* (1984 b), devido à presença de NaCl em solução. Esta fracção foi dialisada contra água e liofilizada ((A-G)₂).

A extracção do resíduo R₂ com 30 ml de *terc*-butanol 60 % solubilizou as prolaminas 1; após centrifugação a 15000 rpm durante 15 minutos, obteve-se um sobrenadante e um resíduo (R₃). O sobrenadante foi dialisado contra água e liofilizado, obtendo-se desta forma a fracção proteica denominada prolaminas 1 (P₁).

O resíduo (R₃) foi extraído com *terc*-butanol 60 % e β-mercaptoetanol 1 %. Desta forma foram colocadas em solução as prolaminas 2, estas foram separadas do resíduo (R₄) por centrifugação a 15000 rpm durante 15 minutos, dialisadas e liofilizadas (P₂). O resíduo (R₄) foi extraído com tampão alcalino constituído por borato de sódio 0,65 %, NaOH 0,19 % e SDS 0,05 %, de modo a extrair as glutelinas. Após centrifugação a 15000 rpm durante 15 minutos a fracção de glutelinas foi dialisada contra água e liofilizada (G) (Fig. 6).

Tendo em vista a remoção de amido gelatinizado, as amostras de farinha cozidas foram tratadas com α-amilase (Boehringer) previamente ao fraccionamento proteico.

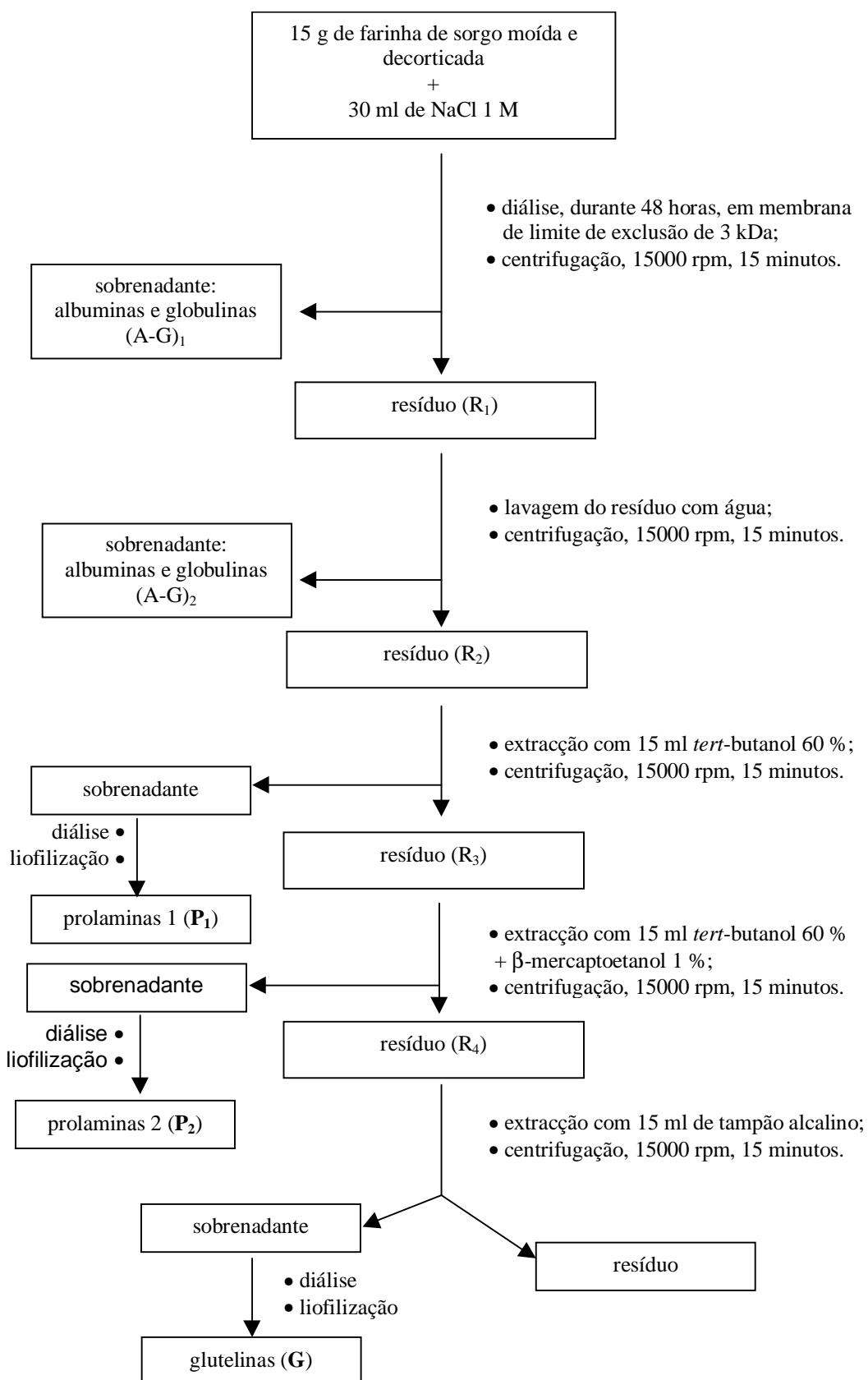


Fig. 6 - Esquema do tipo de fraccionamento proteico utilizado.

3. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

3.1 Separação electroforética

A separação electroforética de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) (Shewry *et al.*, 1995), foi efectuada em sistema Mini Protean II (BioRad) ou em sistema Phast System (Pharmacia).

Para determinação dos perfis electroforéticos das amostras de prolaminas e glutelinas, assim como para análise das fracções de cromatografia de exclusão molecular em resina S-100 foi efectuada electroforese em sistema Mini Protean II (BioRad). Após vários ensaios preliminares determinou-se que a composição ideal do gel seria: acrilamida 15 % e bis-acrilamida 0,4 % em 1,5 M Tris e na presença de SDS 0,1 % (p/v). A polimerização dos géis foi obtida por adição de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) 42,5 mM e persulfato de amónio (APS) 0,05 % (p/v). As amostras aplicadas no gel foram preparadas por fervura, durante 5 minutos, após adição de igual volume de solução desnaturante constituída por Tris 0,0625 M, SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (v/v) (adicionado na altura da análise quando se pretendia efectuar análise em condições redutoras), ureia 8 M, glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,08 % (p/v). A separação electroforética decorreu 45 minutos a 150 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução de Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8.3 e 0,1 % de SDS.

Para análise de proteínas separadas por RP-HPLC e por SDS-PAGE semi-preparativo foi efectuada SDS-PAGE em sistema Phast System em géis de poliacrilamida PhastGels Homogeneous 20 (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante (Separation Technique file nº 111). Neste caso as amostras aplicadas ao gel foram preparadas numa concentração final de SDS 2,5 % (p/v).

3.2. Revelação de proteínas

A revelação das proteínas separadas em electroforese em sistema Mini Protean II foi efectuada utilizando dois métodos de coloração. A coloração com azul de Coomassie, foi aplicada para quantidades de proteína de cerca 1 µg por banda. A coloração com nitrato de prata foi aplicada para revelação de quantidades de proteína de cerca 0,1 µg por banda (Shewry *et al.*, 1995).

A coloração dos géis com azul de Coomassie (R 250) foi efectuada com uma solução deste corante a 0,25 % (p/v) em solução de metanol 25 % (v/v) e ácido acético 5 % (v/v). Após a separação electroforética os géis foram colocados num recipiente contendo a solução de coloração durante 1 hora. A descoloração efectuou-se com uma solução de composição semelhante à descrita anteriormente, mas desta vez na ausência de corante.

Os géis a revelar com nitrato de prata (método de coloração 100 vezes mais sensível que o do azul de Coomassie) foram previamente corridos, antes da aplicação das amostras, durante 1 hora a 150 V, com a polaridade invertida, de modo à total eliminação dos possíveis contaminantes que possam interferir com a coloração. Após aplicação das amostras e sua separação electroforética, como anteriormente descrito, os géis foram imersos numa solução de metanol 50 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v), durante 30 minutos, em seguida esta solução foi substituída por uma outra de metanol 5 % (v/v) e ácido acético 7,5 % (v/v), durante pelo menos mais 30 minutos. O passo seguinte consiste na sensibilização dos géis numa solução de glutaraldeído 7 %, durante 1 hora. Após os restos de glutaraldeído serem removidos com quatro lavagens de 15 minutos com água bidestilada os géis já estão prontos para serem submetidos ao passo de coloração, propriamente dito. Para a coloração foi usada uma solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v) em solução de amónia 0,25 % (v/v). A solução de amónia foi preparada por alcalinização de amoníaco 25 % (v/v) com hidróxido de sódio 1 M (1 ml de amoníaco: 1,875 ml de hidróxido de sódio). Assim como a preparação da solução corante, este passo decorreu durante 25 minutos na ausência da luz. Findo este passo os géis foram lavados 3 vezes com água bidestilada, demorando cada lavagem 5 minutos, de modo a obter a remoção total do nitrato de prata. Em seguida procedeu-se à revelação, este passo foi efectuado por imersão dos géis em solução de formaldeído 1,85 % (v/v) em ácido cítrico 0,25 % (p/v), até ao

aparecimento de bandas castanhas. A reacção foi parada por lavagem rápida com água bidestilada seguida de imersão em ácido acético 1 % (v/v), solução na qual os géis ficaram armazenados até à sua secagem.

No caso das proteínas analisadas por Phast System a coloração foi sempre efectuada com nitrato de prata, segundo indicações do manual (PhastgelTM Silver Kit, Pharmacia).

Em ambos os sistemas a mobilidade electroforética das proteínas foi comparada com a mobilidade electroforética de proteínas de massa molecular conhecida (padrões). Para a electroforese em sistema Mini Protean foram utilizados os seguintes padrões: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116,5 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisosima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) (Broad Range Markers da Bio-Rad). No caso de análises em Phast System os padrões utilizados foram Low Range Markers da Bio-Rad; estes, em comparação com os anteriores, não possuem as duas proteínas de maior peso molecular nem a proteína de inferior peso molecular.

Os géis de SDS-PAGE, após terem sido secos entre membranas de celulose (Bio-Rad) foram digitalizados. As respectivas imagens foram convertidas numa matriz representativa dos diferentes níveis de cor (pseudo-imagem).

De modo a obter-se o perfil electroforético de cada amostra, as respectivas pseudo-imagens foram tratadas segundo um filtro proposto por Barros *et al.* (1997). Este tratamento, baseado em probabilidades conjuntas, calcula uma distribuição (normal) mais provável para a informação contida na imagem do gel. O perfil electroforético de cada amostra é obtido tendo em conta o máximo dessa distribuição.

As áreas apresentadas, junto a cada perfil electroforético, foram calculadas no programa Origin[®], Microcal software Inc., USA.

3.3. SDS-PAGE Semi-Preparativa

Aplicou-se, o método de SDS-PAGE semi-preparativo desenvolvido por Watterson *et al.* em 1993 às amostras de prolaminas 1 extraídas a partir da farinha crua da variedade NK283 e as prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinhas cozidas das variedades de sorgo NK283 e Kenyan Local White.

Imediatamente após electroforese (nas condições descritas em Capítulo II.3.1), o gel foi corado com solução de azul de Coomassie de modo às bandas de proteína serem visualizadas. As bandas correspondentes aos polipéptidos de pesos moleculares de 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa e ainda as bandas correspondentes às kafirinas $\alpha+\gamma$, kafirina β e polifenóis foram cortadas dos géis de SDS-PAGE das amostras de prolaminas e extraídas, a partir das respectivas bandas, em condições redutoras. A proteína foi extraída do gel após moagem deste em tampão extractor constituído por: 0,1 % de SDS, 0,5 M de Tris, 1 mM de EDTA e 5 mM de DTT (Watterson *et al.*, 1993). Os pedaços de gel foram removidos por filtração e em solução estava a proteína a ser analisada, novamente, por SDS-PAGE. Desta vez a solução de proteína foi aplicada directamente em gel de poliacrilamida em Phast System (PhastGel homogeneous 20 %). Este novo ensaio electroforético mostra os monómeros constituintes de cada uma das proteínas poliméricas. Com este procedimento tentou estudar-se a composição de cada uma das bandas electroforéticas pertencentes ao perfil electroforético das amostras de prolaminas em questão.

4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

PCA é, essencialmente, um método descritivo utilizado como o primeiro passo da análise dos dados.

Este método permite a visualização das variabilidades principais do conjunto das amostras (sem a restrição de as tentar relacionar) e relaciona amostras com as respectivas respostas (variáveis). O objectivo principal é encontrar relações entre diferentes parâmetros (objectos e variáveis) e/ou a detecção de possíveis ‘clusters’ entre objectos e/ou variáveis.

De modo a determinar a principal fonte de variabilidade de um conjunto de amostras e a relação entre objectos e variáveis a matriz original, definida por $X_{(n, m)}$, é decomposta em matrizes que representam o espaço do objecto (amostras), o espaço das variáveis e a matriz erro (variações não tomadas em consideração pelos componentes principais empregues na análise).

A decomposição é formalizada por:

$$X_{(n, m)} = T_{(n, k)} P_{(k, m)}^T + E_{(n, m)}$$

onde **T** é a matriz ‘projectão dos indivíduos’, **P** a matriz ‘vectores próprios ponderados’, **E** a matriz erro, n o número de objectos (amostras), m o número de variáveis e k o número de componentes principais usados (Jolliffe et al., 1986).

Esta técnica foi utilizada para facilitar o estudo dos perfis electroforéticos das amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas de farinhas cruas e cozidas das variedades NK283 e Kenyan Local White. Esta técnica também serviu como instrumento de análise dos espectros de FTIR das referidas amostras.

5. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283

Na tentativa de melhorar os resultados obtidos por C.E.M. da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 tentaram remover-se os polifenóis; para tal testaram-se três métodos. Um dos tratamentos consistiu em lavar a amostra, após desengordurada com éter de petróleo, com uma mistura de água:acetona:éter etílico (6:14:10 v/v/v). Este tratamento foi desenvolvido por Terril *et al.* (1992) para extracção de polifenóis de farinha de sorgo.

Testaram-se, ainda, dois métodos envolvendo SDS.

Num dos métodos promove-se a solubilização da fracção de prolaminas 1 em solução de ureia 3 M e SDS 1 % (m/v) seguindo-se diálise em mangas de diálise com limite de exclusão de 3 kDa. Desta forma os compostos fenólicos de baixo peso molecular podem abandonar a manga de diálise mas nenhum dos polipéptidos constituintes da fracção de prolaminas abandona a manga de diálise. A proteína foi analisada por FTIR antes e após o referido tratamento.

Uma outra tentativa de remoção dos polifenóis envolve cromatografia de exclusão molecular em coluna de Saphacryl S-100 utilizando, como eluente, ureia 3 M e SDS 1 % (m/v) (Capítulo II.5.1.2.).

6. CROMATOGRAFIA DE COLUNA

6.1. Cromatografia de exclusão molecular de baixa pressão

As cromatografias de exclusão molecular de baixa pressão foram efectuadas à temperatura ambiente. A preparação das resinas utilizadas para este tipo de cromatografia decorreu, também, à temperatura ambiente e de acordo com as instruções do fabricante. Os tampões usados foram previamente filtrados por filtro de 0,45 μm e desgaseificados. O fluxo de eluente, adequado a cada cromatografia, foi estabelecido por uma bomba peristáltica Miniplus 2 da Gilson. As fracções foram colectadas num colector de fracções RediFrac da Pharmacia e a absorvância do eluato foi continuamente medida a 280 nm por um detector 112 UV/Vis Gilson. Os cromatogramas resultantes foram registados por um registador Modelo 201 da Anatron.

6.1.1. Fraccionamento da fracção de prolaminas 1 de duas variedades de sorgo

Na tentativa de fraccionar as prolaminas das variedades de sorgo NK283 e Kenyan Local White testou-se cromatografia de exclusão molecular (C.E.M). Como fase estacionária utilizou-se uma resina Sephacryl S-100, que apresenta uma gama de linearidade entre 10^3 e 10^5 Da (para proteínas globulares), como fase móvel utilizou-se etanol 80 %, ácido trifluoroacético (TFA) 0,16 M e bicarbonato de amónio (NH_4HCO_3) 0,25 M. Foi escolhido como eluente etanol 80 %, uma vez que este álcool foi durante muito tempo o solvente universal para todo o tipo de prolaminas. Para além deste factor influenciou, também, a escolha do eluente cromatográfico o facto da utilização de *terc*-butanol como eluente cromatográfico envolver custos elevados e da dificuldade de manuseamento deste álcool em cromatografia. O bicarbonato de amónio serviu para aumentar o pH, que com a presença de TFA desce em demasia. O TFA fazia parte da composição do eluente para minimizar a interacção entre a amostra e a fase estacionária. A coluna utilizada para exclusão molecular (XK 26 da Pharmacia) apresentava as dimensões seguintes: 100 cm de comprimento por 26 cm de diâmetro.

A primeira amostra a ser submetida ao fraccionamento foi a fracção de prolaminas 1 da variedade NK283. 200 mg desta fracção proteica foram solubilizadas no eluente em causa. Logo após a amostra ser aplicada na coluna cromatográfica fracções de 10 minutos começaram a ser colectadas. A coluna apresentava um caudal de 1 ml / min. Durante todo o tempo que decorreu a cromatografia a absorvância do eluato foi continuamente medida a 280 nm.

Para o fraccionamento da fracção de prolaminas da amostra Kenyan Local White o procedimento cromatográfico foi idêntico.

Após separação cromatográfica os picos colectados foram analisados por SDS-PAGE. 500 µl de cada um dos picos cromatográficos colectados foram concentrados até à secura sob corrente de azoto e o resíduo dissolvido em 50 µl de tampão da amostra. Após fervura as amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE de 15 % em acrilamida, em seguida foram revelados com Coomassie.

Foram realizadas várias cromatografias de cada uma das amostras. As fracções colectadas foram agrupadas de acordo com resultados da análise por SDS-PAGE e dialisadas contra água, de modo a remover etanol, TFA e NH_4HCO_3 . Em seguida foram concentradas por liofilização.

6.1.2. Remoção de polifenóis da fracção de prolaminas 1 da variedade NK283

Para remoção de polifenóis utilizando cromatografia de exclusão molecular utilizou-se uma coluna de Saphacryl S-100 utilizando, como eluente, ureia 3 M e SDS 1 % (m/v) A coluna apresentava um caudal de 0,6 ml por minuto.

200 mg de amostra foram dissolvidas no referido eluente. Previamente à aplicação da amostra na coluna cromatográfica aquela foi submetida a ultra-sons durante 15 minutos, posteriormente foi centrifugada a 7000 G durante 10 minutos e finalmente foi filtrada por filtro de porosidade 0,45 µm.

Os picos colectados (10 ml por tubo), detectados a 280 nm, foram analisados um a um por SDS-PAGE num gel de 15 % em acrilamida. Para preparação da amostra para electroforese a uma alíquota de 100 µl de cada fracção foi adicionado 5 µl de SDS 25 % (m/v) e uma gota de glicerol com azul de bromofenol.

A fracção de proteínas obtida por C.E.M., após diálise e liofilização foi, também, analisada por FTIR e por RMN.

6.2. HPLC

6.2.1. Separação de prolaminas

Para separação, por RP-HPLC, da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 foi utilizada uma coluna Waters RP C18 (300 Å, 15 µm, 300 mm x 3.9 mm i.d.) acoplada a um cromatógrafo Gilson. A absorvância foi medida continuamente com um detector Chrom A Scope UV/Vis (BarSpec).

A concentração da solução de proteínas foi a mesma da do ensaio descrito anteriormente, mas desta vez, para garantir a solubilização completa da amostra o solvente utilizado foi ureia 8 M. A coluna empregue neste ensaio foi uma Waters RP C18 (300 Å, 15 µm, 300 mm x 3.9 mm i.d.). A eluição foi conseguida com os mesmos eluentes e empregando o mesmo gradiente de eluição. A absorvância foi medida continuamente a 210 nm e 280 nm num detector Chrom A Scope, BarSpec UV/VIS. Os diversos picos eluidos da coluna foram colectados, concentrados e analisados por SDS-PAGE em sistema Phast-System. Os géis foram revelados com nitrato de prata.

6.2.2. Obtenção dos perfis cromatográficos das prolaminas da variedade NK283

Para obtenção dos perfis cromatográficos das amostras de prolaminas P1, P1C, P2 e P2C extraídas de farinha da variedade NK283 foi utilizada uma coluna Merck 50983 Lichrospher 100 RP18 (100 Å, 5 µm, 250 mm x 4 mm d.i.), acoplada a um cromatógrafo Merck equipado com uma Merck Hitachi I-6200A Intelligent Pump. A absorvância foi medida continuamente com um detector UV-Vis Merck Hitachi L-4250. Os cromatogramas foram registados num Merck D-2500 Chromato-Integrator.

As amostras de proteínas analisadas foram solubilizadas em *tert*-butanol 60 % ou ureia 8 M, foram sonicadas durante 10 minutos, centrifugadas a 10000 G durante 5 minutos, apenas o sobrenadante foi aplicado na coluna cromatográfica. Foram aplicados 20 µl das soluções (1,5 mg/ml) obtidas.

Procedeu-se à eluição com gradiente linear de 65 a 100 % de acetonitrilo durante 25 minutos. O gradiente foi conseguido misturando dois eluentes: água contendo 10 % de acetonitrilo e 0,06 % TFA e acetonitrilo com 0,05 % TFA. A absorvância foi medida continuamente a 210 nm e 280 nm com um detector Merck Hitachi L-4280 UV/Vis.

Os solventes utilizados foram de grau HPLC, foram filtrados em filtros de poro 0,22 μm e desgaseificados.

7. FTIR

Os espectros de FTIR Médio das pastilhas de KBr de proteínas foram obtidos num aparelho Bruker IFS 55, com resolução 8 cm^{-1} , após acumulação de 256 scans.

Por esta técnica foram analisadas amostras de prolaminas 1 e prolaminas 2 extraídas de farinha de sorgo da variedade NK283 e Kenyan Local White. Algumas das amostras de prolaminas obtidas após fraccionamento em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 com etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M foram também analisadas por FTIR. Foram ainda analisadas por esta técnica amostras de prolaminas 1 extraídas de farinha de sorgo da variedade NK283 com diferentes teores em polifonias.

8. RMN

As experiências de RMN de estado sólido foram obtidas num espectrómetro Bruker MST 400 P operando a 400,13 MHz para protão e 100,62 MHz para carbono. Para CP-MAS foi utilizada uma sonda de 4 mm. O espectro de ^{13}C CP/MAS foi obtido utilizando um pulso longo de 90° , de aproximadamente 4,5 ms, com um tempo de contacto de 2,5 ms e tempo de espera de 3 s. Ensaio de ^{13}C SPE foram obtidos com tempo de espera entre pulsos de 4 s. Os espectros de H MAS foram obtidos com tempo de espera entre pulsos de 3 s e um pulso longo de aproximadamente 4-5 ms. O número de acumulações (NA) e velocidades de rotação (VR) estão indicados no espectro de cada amostra.

Foram analisadas por esta técnica espectroscópica prolaminas 1 da variedade NK283 antes e após tratamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-100 eluída com 3 M de ureia e SDS 1 %.

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

“O conhecido é finito, o desconhecido infinito; intelectualmente, estamos numa ilha no meio dum oceano ilimitado de inexplicabilidade. O nosso dever em cada geração é recuperar um pouco mais de terra.”
T. H. Huxley

1. INTRODUÇÃO
2. CARACTERIZAÇÃO DAS FRACÇÃO DE PROLAMINAS DE DUAS VARIEDADES DE SORGO
 - 2.1. Caracterização electroforética
 - 2.2. Caracterização das Prolaminas da Variedade NK283 por RP-HPLC
3. FRACCIONAMENTO DAS PROLAMINAS 1 DE DUAS VARIEDADES DE SORGO
 - 3.1. Prolaminas 1 da variedade NK283
 - 3.2. Prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White
 - 3.3. Conclusões
4. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283
 - 4.1. Extração com solventes orgânicos
 - 4.2. Diálise na presença de SDS
 - 4.3. C.E.M. usando ureia e SDS como eluente
 - 4.4. Conclusões e discussão
5. O PROBLEMA DA DIMINUIÇÃO DE DIGESTIBILIDADE DAS PROLAMINAS COM COZIMENTO
Conclusões e discussão
6. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO DE PROLAMINAS POR FTIR
Conclusões

1. INTRODUÇÃO

Quando se deu início ao presente trabalho de investigação, tendo com base a revisão bibliográfica, partiu-se dos seguintes pressupostos:

- o cozimento poderá incrementar as ligações, por pontes dissulfeto, entre as kafirinas, bem como alteração da sua hidrofobicidade;
- será possível efectuar uma separação das diferentes fracções proteicas das prolaminas de sorgo de modo a proceder à sua posterior caracterização e verificação do pressuposto anterior;
- parecem existir polifenóis que contribuem para a aglomeração das prolaminas de sorgo.

Neste contexto procedeu-se à caracterização por SDS-PAGE da fracção de prolaminas de sorgo de modo a conseguir detectar diferenças entre a fracção de prolaminas extraídas a partir de sorgo cru e de sorgo cozido. Esta caracterização foi efectuada em duas variedades de sorgo (NK283 e Kenyan Local White) que apresentavam características morfológicas e funcionais bastante distintas. De modo a verificar a presença de pontes de dissulfeto foi realizado o estudo electroforético, em condições redutoras, de cada uma das amostras.

De modo a estudar as alterações de hidrofobicidade das prolaminas em função do tratamento térmico foi realizado HPLC em fase reversa (RP-HPLC).

Uma vez que por esta técnica cromatográfica foram obtidas quantidades reduzidas de proteína, as amostras assim fraccionadas serviram unicamente para serem caracterizadas por SDS-PAGE (em Phast-System). Então, tentou-se o fraccionamento da amostra de prolaminas de sorgo por cromatografia de exclusão molecular (C.E.M.). A obtenção das fracções purificadas das diferentes kafirinas teria como objectivo estudar qual o efeito do tratamento térmico na fracção de prolaminas, nomeadamente no que diz respeito à formação de pontes de dissulfeto e alteração de hidrofobicidade.

O fraccionamento das prolaminas mostrou-se difícil e revelou a presença de polifenóis ligados a esta fracção proteica. Este facto conduziu a estudos sobre formas de remoção de polifenóis e a uma revisão dos pressupostos iniciais sobre o papel destes nas suas interacções com as prolaminas.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS FRACÇÃO DE PROLAMINAS DE DUAS VARIEDADES DE SORGO

2.1. Caracterização electroforética

Após vários ensaios preliminares de SDS-PAGE verificou-se que a concentração em acrilamida dos géis utilizados para análise das amostras de prolaminas 1 e 2 de sorgo deveria ser 15 %. Com concentrações de acrilamida inferiores a malha do gel seria demasiado grande; os polipéptidos de baixos pesos moleculares, nomeadamente a kafirina β e o polipéptido de 14 kDa eluíriam do gel antes da finalização da corrida electroforética. Caso se utilizassem concentrações de acrilamida superiores a 15 % a malha do gel ficaria demasiado apertada o que dificultaria uma boa separação das bandas correspondentes a polipéptidos de pesos moleculares superiores; neste caso perder-se-ia resolução.

2.1.1. Prolaminas 1 extraídas a partir da variedade NK283

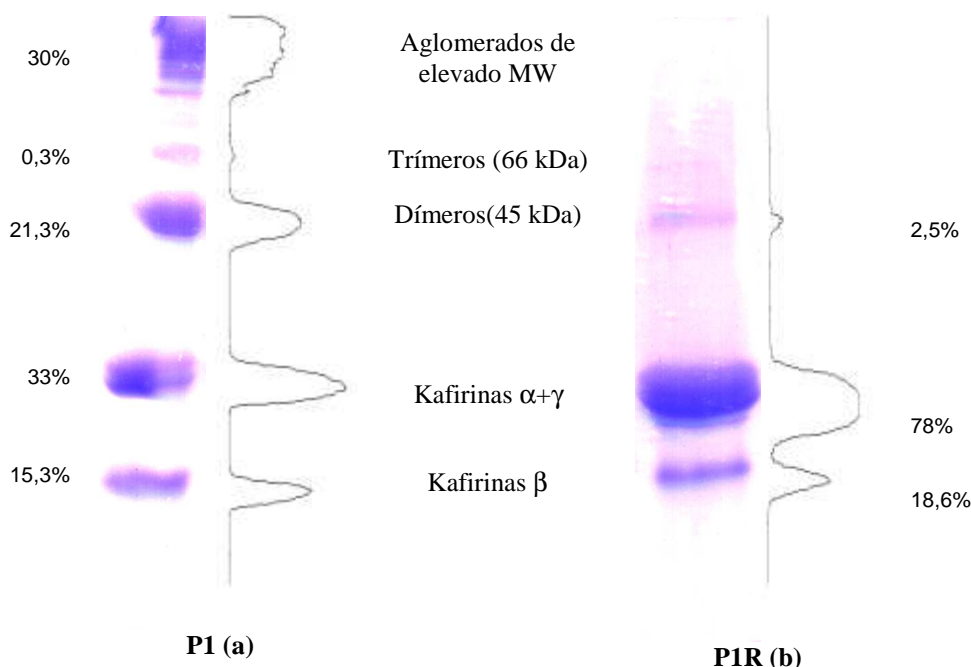


Fig. 7 - Perfil electroforético da amostra de **P1**, extraída a partir de farinha **não cozida** da variedade de sorgo **NK283**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

O comportamento electroforético, em géis de SDS-PAGE 15 % revelados com azul de Coomassie, das prolaminas 1 da variedade de sorgo NK283 (extraída com solução de *tert*-butanol 60 %) revela que esta amostra é constituída por aglomerados de elevado peso molecular (> 97 kDa), uma proteína de peso molecular próximo de 66 kDa, uma outra de peso molecular aproximado de 45 kDa, pelas kafirinas $\alpha+\gamma$ e pela kafirina β (Fig. 7 a).

Caso a amostra seja estudada na sua forma reduzida, ou seja, se previamente à aplicação da amostra em géis de SDS-PAGE se promover a ruptura das ligações por ponte de dissulfeto, os aglomerados de elevado peso molecular desaparecem, assim como a proteína de 66 kDa. A proteína de 45 kDa diminui significativamente, sem no entanto desaparecer totalmente, e a banda das kafirinas $\alpha + \gamma$ aumenta significativamente. Isto significa que, após redução, algumas das proteínas de elevado peso molecular despolimerizam (por ruptura das ligações S-S) libertando-se os seus monómeros: as kafirinas $\alpha + \gamma$ e β (Fig. 7 b).

Estes resultados conduzem à hipótese da existência de dois tipos de proteínas de peso molecular muito semelhante, por volta de 45 kDa. Uma vez que parte desta proteína é reduzida e parte mantêm-se inalterada com a redução.

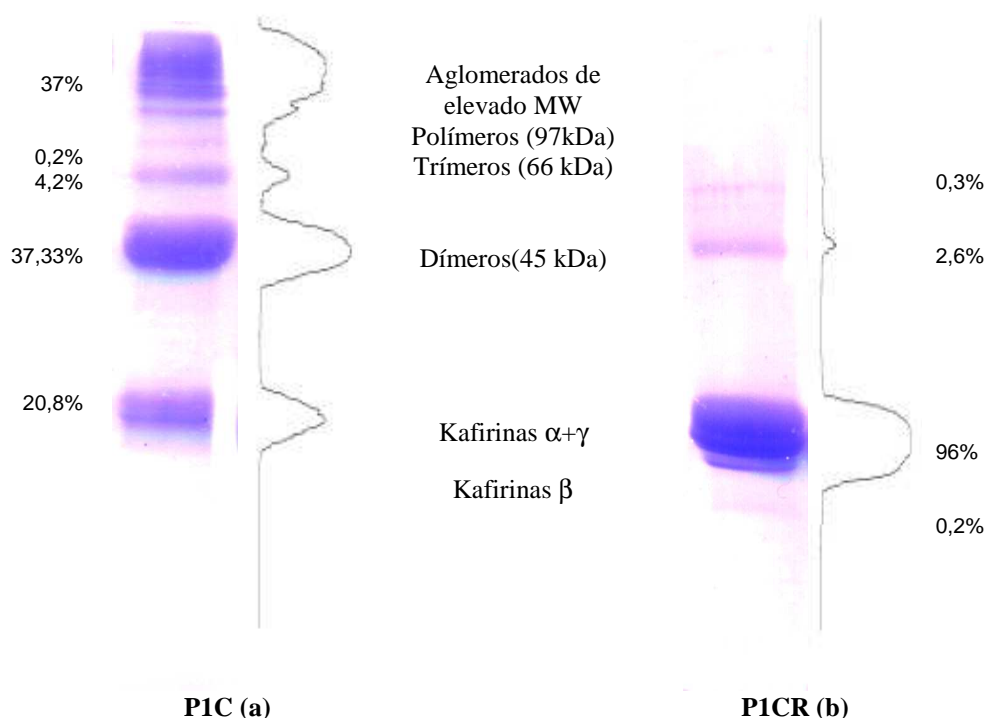


Fig. 8 - Perfil electroforético da amostra de **P1**, extraída a partir de farinha **cozida** da variedade de sorgo **NK283**, **(a)** não reduzida e **(b)** reduzida.

Quando são analisadas amostras de prolaminas 1 extraídas a partir de amostras de farinha de sorgo cozida em água verifica-se que o seu comportamento electroforético é ligeiramente alterado. Taylor *et al.* (1998) determinaram os valores de digestibilidade proteica das amostras de farinha e das fracções de prolaminas empregues neste estudo. Verificaram que o cozimento da farinha de sorgo induz uma diminuição dos valores de digestibilidade da farinha de sorgo e que essa diminuição se faz sentir mais acentuadamente na fracção de prolaminas. É então natural, que a fracção proteica em questão sofra alterações estruturais com o cozimento e que estas alterações se reflectam no seu perfil electroforético (Fig. 8 a).

A análise dos géis de SDS-PAGE das amostras cozidas e dos referidos perfis mostra que com o cozimento os aglomerados de elevados peso molecular aumentam ligeiramente, verifica-se ainda o aparecimento de uma proteína de peso aproximado de 97 kDa, nota-se um incremento no teor das proteínas de 66 e 45 kDa. Em contrapartida é observado um decréscimo no teor em kafirinas $\alpha+\gamma$ e o desaparecimento da kafirina β .

O incremento das proteínas de peso molecular superior pode estar na base da diminuição dos valores de digestibilidade das prolaminas de sorgo com o cozimento. Com este tratamento da farinha, os monómeros podem passar a estabelecer ligações que não possuíam na farinha crua, formando aglomerados de peso molecular elevado.

Quando a amostra é estudada na forma reduzida algumas das proteínas de peso molecular elevado desaparecem, nomeadamente os aglomerados de elevado peso molecular e a proteína de 97 kDa. As proteínas de 66 kDa e de 45 kDa diminuem significativamente, mas não desaparecem totalmente. Como seria de esperar, paralelamente, verifica-se um incremento da quantidade de kafirinas α , γ e β . Curioso é o facto da kafirina β desaparecer com o cozimento e de após redução da amostra voltar a aparecer, embora em proporção bastante inferior. Desta forma prova-se que, de facto, aquando do cozimento ocorrem alterações nas proteínas: a kafirina β com o cozimento aglomera-se com kafirinas α e/ou γ para formação de polipéptidos de pesos moleculares superiores. O tipo de ligação estabelecida entre os monómeros não parece ser exclusivamente por pontes dissulfeto uma vez que após redução as proteínas de 66 e 45 kDa não desaparecem e a quantidade de kafirina β que aparece após redução não corresponde à inicial (ou seja não está na mesma proporção que aparece na amostra de prolaminas 1 extraídas de farinha crua) (Fig. 8 b).

De acordo com a literatura o cozimento da farinha provoca um aumento da fracção de glutelinas (Hamaker *et al.*, 1986). Portanto, não se pode excluir que parte das prolaminas tenham passado para a fracção das glutelinas. Por este motivo esta fracção proteica foi analisada por SDS-PAGE.

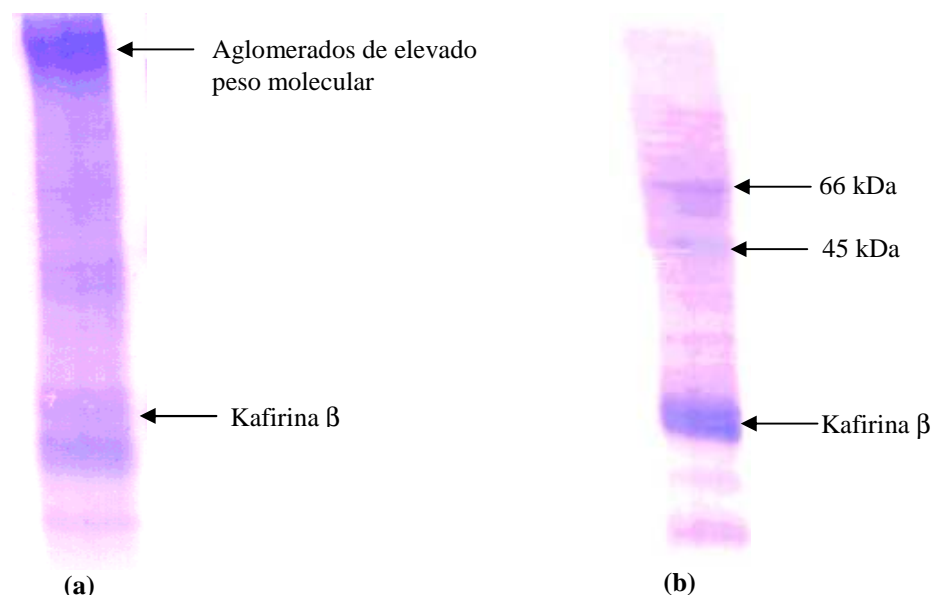


Fig. 9 - Amostra de **glutelinas** (a) não reduzidas e (b) reduzidas, extraídas a partir de farinha **cozida** da variedade **NK283** analisada por SDS-PAGE em gel de acrilamida 15 %

Os géis de SDS-PAGE apresentados na figura anterior mostram, de facto, a presença de kafirina β na amostra de glutelinas extraídas a partir farinha NK283 cozida (Fig. 9 a). A quantidade desta kafirina aumenta, significativamente, quando a amostra é estudada em condições redutoras (Fig. 9b) parecendo existir, simultaneamente, libertação de polipéptidos de 66 e 45 kDa como consequência do desaparecimento dos aglomerados de elevado peso molecular que estavam presentes na amostra não reduzida.

A fracção de glutelinas extraída de farinha crua foi também analisada de modo a verificar se a kafirina β estava ou não presente na referida fracção proteica.

A presença de kafirina β não foi detectada, por SDS-PAGE, em amostras de glutelinas extraídas a partir de farinha NK283 crua. No caso da fracção de glutelinas analisada em condições redutoras pode encontrar-se uma pequena quantidade de kafirina β ; no entanto a sua quantidade não se pode comparar com a presente nas amostras de glutelinas extraídas a partir de farinha cozida (Fig. 10).

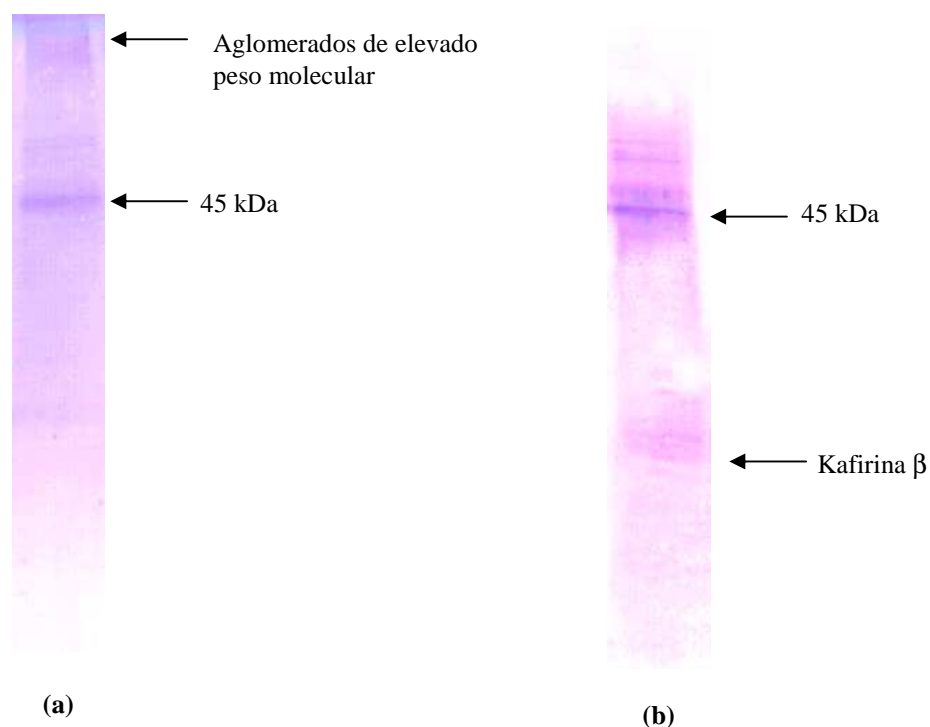


Fig. 10 - Amostra de **glutelinas** (a) não reduzidas e (b) reduzidas, extraídas a partir de farinha da variedade **NK283** analisada por SDS-PAGE em gel de acrilamida 15 %.

Então, com o cozimento, parte da kafirina β passa a fazer parte da fracção de glutelinas.

Tal como foi verificado em trabalhos anteriores (Beckwith, 1972 e Sastry *et al.*, 1986), nota-se uma certa dificuldade de visualização das bandas electroforéticas nos géis referentes a amostras de glutelinas. Isto deve-se ao facto de se tratar de proteínas que apresentam elevados pesos moleculares. Há necessidade de, em estudos posteriores, se tentar melhorar as condições de análise destas proteínas por SDS-PAGE, para clarificar o papel da kafirina β e dos polipéptidos de 66 e 45 kDa na diminuição da solubilidade e consequentemente na digestibilidade de prolaminas de sorgo extraídas a partir de farinha cozida.

2.1.2. Prolaminas 2 extraídas a partir da variedade de sorgo NK283

A fracção proteica de prolaminas 2 é extraída com solução alcoólica (*terc*-butanol 60 %) na presença de agente redutor. Por este motivo, não é de estranhar que no perfil electroforético deste tipo de amostras não estejam presentes os aglomerados de elevado peso molecular.

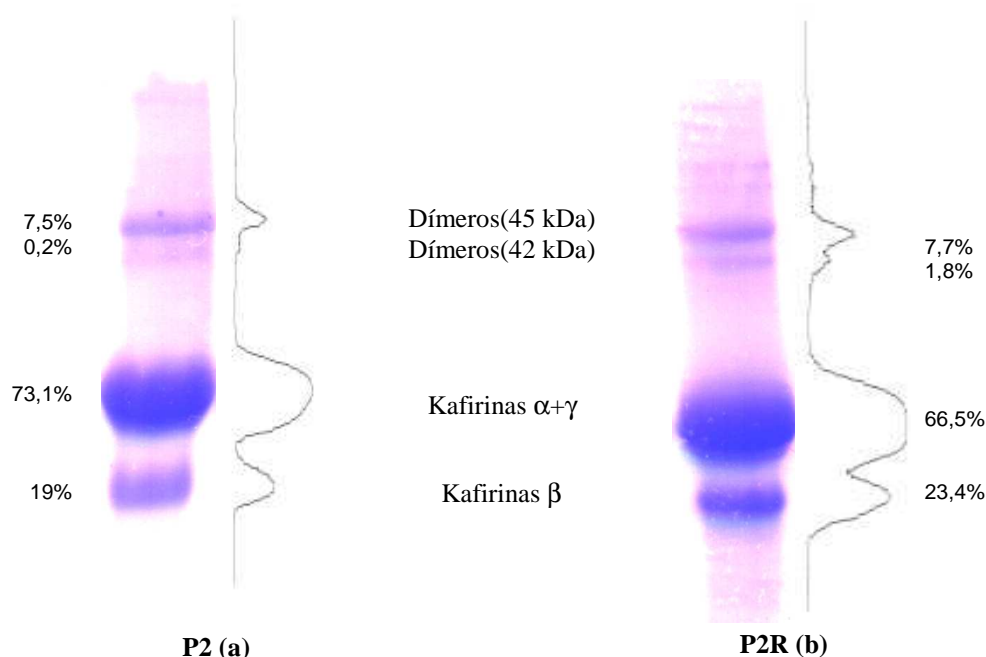


Fig. 11 - Perfil electroforético da amostra de **P2**, extraída a partir de farinha **não cozida** da variedade de sorgo **NK283**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

De acordo com resultados de SDS-PAGE em géis de 15 % revelados com azul de Coomassie a fracção de prolaminas 2 da variedade de sorgo NK283 apresenta uma proteína de peso molecular aparente de 45 kDa, uma outra de peso molecular inferior, cerca de 42 kDa, para além das kafirinas α , γ e β . As kafirinas $\alpha + \gamma$ constituem a fracção proteica mais abundante. A kafirina β está presente em quantidades semelhantes às da amostra de prolaminas 1 (Fig. 11 a). Quando esta amostra é estudada na presença de agente redutor a sua composição quer quantitativa quer qualitativa é bastante semelhante. Isto significa que após extracção as proteínas constituintes desta fracção não sofreram oxidação, ou seja, as ligações S-S não voltaram a ser estabelecidas.

Para além disso a presença da proteína não redutível de 45 kDa volta a confirmar-se. Em relação à proteína de, aproximadamente, 42 kDa, presente em quantidades vestigiais, também parece não ser susceptível a redução (Fig. 11 b).

No que diz respeito à fracção proteica de prolaminas 2 extraídas a partir da amostra de farinha cozida verifica-se um incremento das bandas electroforéticas referentes aos aglomerados de elevado peso molecular (Fig. 12 a). Mais uma vez se confirma o efeito do cozimento no aparecimento de proteínas de elevado peso molecular.

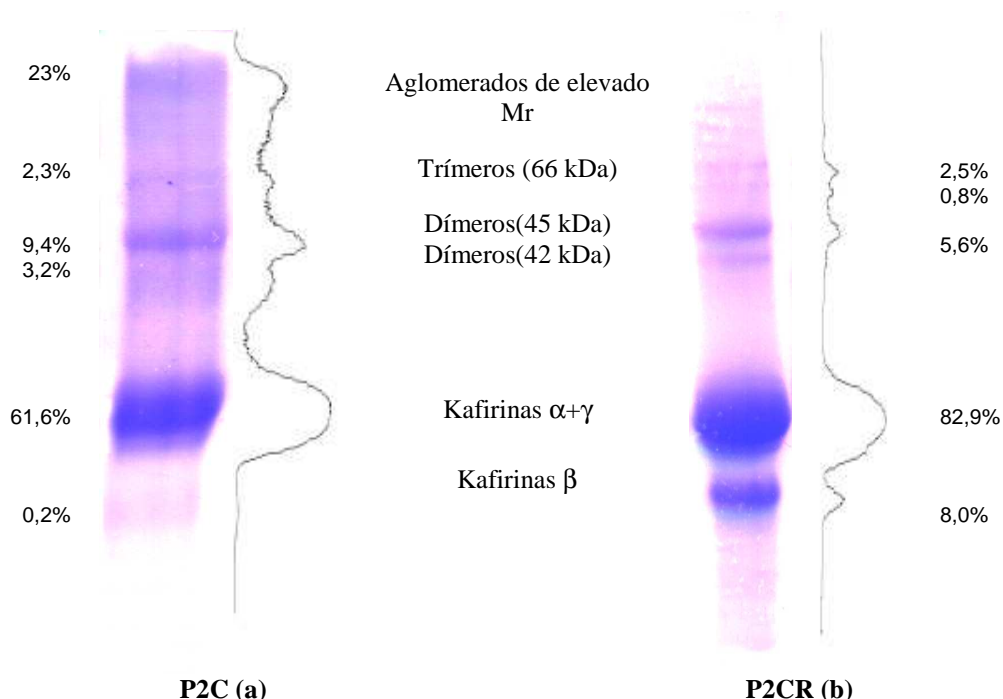


Fig. 12 - Perfil electroforético da amostra de **P2**, extraída a partir de farinha **cozida** da variedade de sorgo **NK283** (a) não reduzida e (b) reduzida.

Com o cozimento surge, também, na fracção de prolaminas 2 uma proteína de peso molecular aproximado de 66 kDa. Nota-se, comparativamente à fracção de prolaminas 2 referentes à farinha crua, um incremento da proteína de 45 kDa assim como da proteína de 42 kDa. Para além destas estão presentes as kafirinas $\alpha+\gamma$ e a kafirina β , se bem que esta última em quantidade muito reduzida. Verificando-se, uma vez mais, o desaparecimento da kafirina β com o cozimento (Fig. 12 a).

O estudo desta fracção na sua forma reduzida mostra o desaparecimento dos aglomerados de elevado peso molecular. Isto confirma que estes são constituídos por monómeros que estabelecem ligações por pontes de dissulfeto. A proteína de 66 kDa matem-se inalterada, quer qualitativa que quantitativamente. Surge uma nova proteína de peso molecular inferior a 66 kDa, que apresenta um peso molecular aproximado de 63 kDa. Esta proteína surgiu após redução dos aglomerados de elevado peso molecular. Uma vez que não é reduzida pela presença de agentes redutores os monómeros que a constituem não devem estabelecer pontes de dissulfeto. A quantidade da proteína de 45 kDa é inferior, em relação à amostra não reduzida. Este facto, mais uma vez, confirma a existência de dois tipos de proteína de 45 kDa, uma com possibilidades de ser reduzida e outra não.

A kafirina β volta a aparecer com a redução, o que mostra que com o cozimento este polipéptido, em conjunto com outros monómeros, passa a fazer parte dos aglomerados que se formam por pontes de dissulfeto. Os restantes monómeros, componentes maioritários desta fracção, são as kafirinas α ou γ , uma vez que com o cozimento a sua quantidade relativa também é significativamente reduzida (Fig. 12 b).

2.1.3. Prolaminas 1 extraídas a partir da variedade Kenyan Local White

Para determinar a composição das prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White foi, também, estudado o seu comportamento electroforético, em SDS-PAGE géis de 15 % revelados com azul de Coomassie.

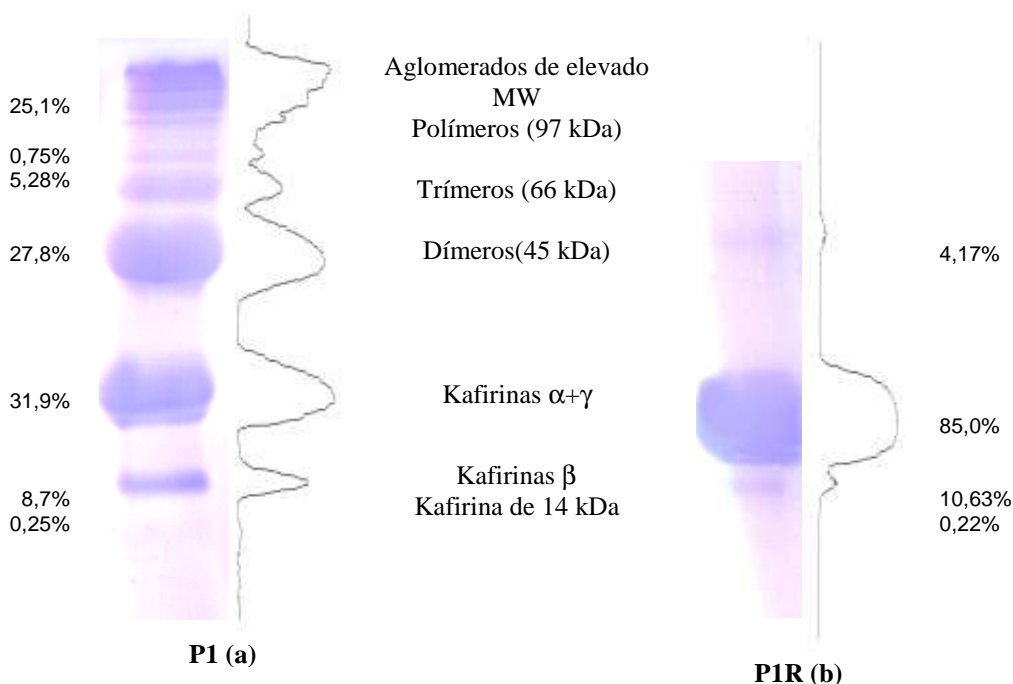


Fig. 13 - Perfil electroforético da amostra de **P1**, extraída a partir de farinha **não cozida** da variedade de sorgo **Kenyan Local White**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

Tal como no caso da variedade NK283 esta amostra é obtida por extracção com solução alcoólica (*tert*-butanol 60 %). A referida amostra é constituída por aglomerados de elevado peso molecular (> 97 kDa). Para além destes apresenta proteínas de pesos moleculares aproximados de 97, 66 e 45 kDa e ainda kafirinas $\alpha+\gamma$ e β . Apresenta, ainda, um polipéptido de 14 kDa. Este polipéptido, não foi encontrado em nenhum outro conjunto de amostras de prolaminas de sorgo (Fig. 13 a).

Se a amostra for estudada na sua forma reduzida os aglomerados de elevado peso molecular desaparecem, assim como as proteínas de 97 e 66 kDa. A proteína de 45 kDa diminui acentuadamente mas não desaparece totalmente com a redução. Isto já se verificava no caso no caso das amostras da variedade NK283. Estes resultados mostram que todas estas proteínas referidas anteriormente (aglomerados de elevado peso molecular, 97, 66 e 45 kDa) são constituídas por monómeros que estabelecem ligações S-S e que existem de dois tipos de proteínas de peso molecular muito semelhante, por volta de 45 kDa, um redutível e outro não redutível.

Os monómeros são kafirinas α , γ e β ; isto porque estas proteínas, em condições redutores, apresentam um incremento na sua concentração. Nesta variedade de sorgo o polipéptido de 14 kDa não parece fazer parte do conjunto dos monómeros constituintes da fracção de prolaminas 1, uma vez que a sua concentração mantém-se com a redução (Fig. 13 b).

Quando se trata de amostras de prolaminas 1 extraídas a partir de amostras de farinha de sorgo cozidas em água o comportamento electroforético das amostra em géis de SDS-PAGE com 15 % de acrilamida é ligeiramente alterado.

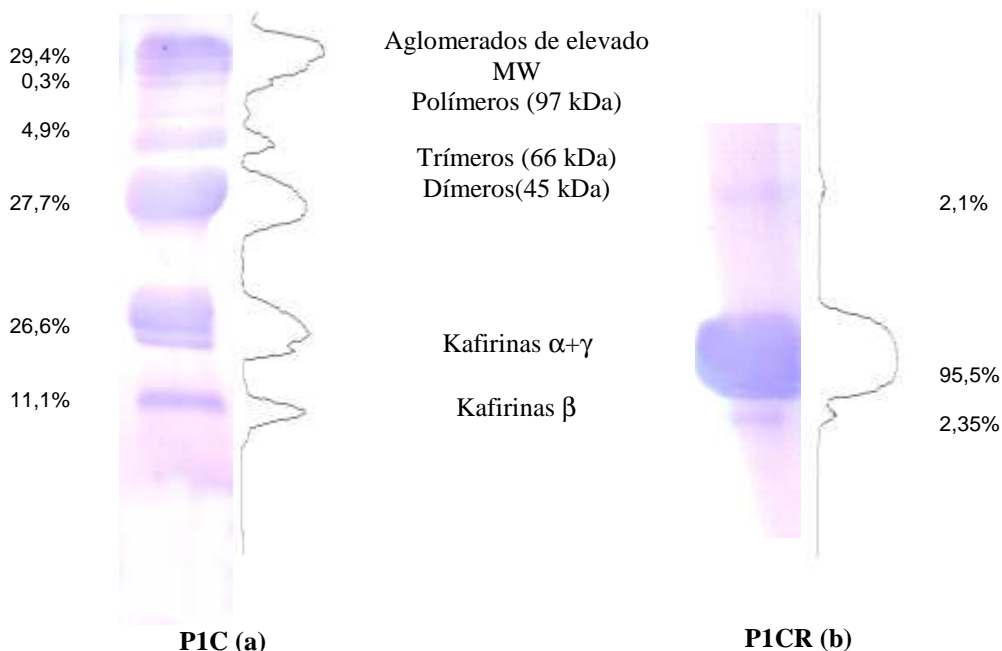


Fig. 14 - Perfil electroforético da amostra de **P1**, extraída a partir de farinha **cozida** da variedade de sorgo **Kenyan Local White**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

Tanto nos géis de SDS-PAGE como nos respectivos perfis pode notar-se que com o cozimento os aglomerados de elevado peso molecular aumentam ligeiramente;

paralelamente, é observado um decréscimo no teor em kafirinas α e γ . A quantidade kafirina β mantém-se, contrariamente ao que ocorre na variedade NK283. O polipéptido de 14 kDa não aparece na fracção de prolaminas 1 correspondente às amostras de farinha cozida da variedade de sorgo em questão.

Com o cozimento os polipéptidos passam a estabelecer ligações que não estabeleciam na farinha crua, formando proteínas de peso molecular mais elevado. O polipéptido de 14 kDa pode estar envolvido, nesta variedade, na formação dos referidos complexos (Fig. 14 a).

Quando a amostra em causa é estudada na forma reduzida algumas das proteínas desaparecem, é o caso dos aglomerados de elevado peso molecular e das proteínas de 97 e 66 kDa. A percentagem da proteína de 45 kDa diminui significativamente não desaparecendo totalmente. Como seria de esperar, paralelamente, verifica-se um incremento da quantidade de kafirinas α e γ . Com redução, a quantidade de kafirina β mantém-se e o polipéptido de 14 kDa não reaparece com a redução. Caso este polipéptido se encontre a fazer parte de aglomerados proteicos não estabelece, certamente pontes S-S mas outro tipo de ligações (Fig. 14 b).

2.1.4. Prolaminas 2 extraídas a partir da variedade *Kenyan Local White*

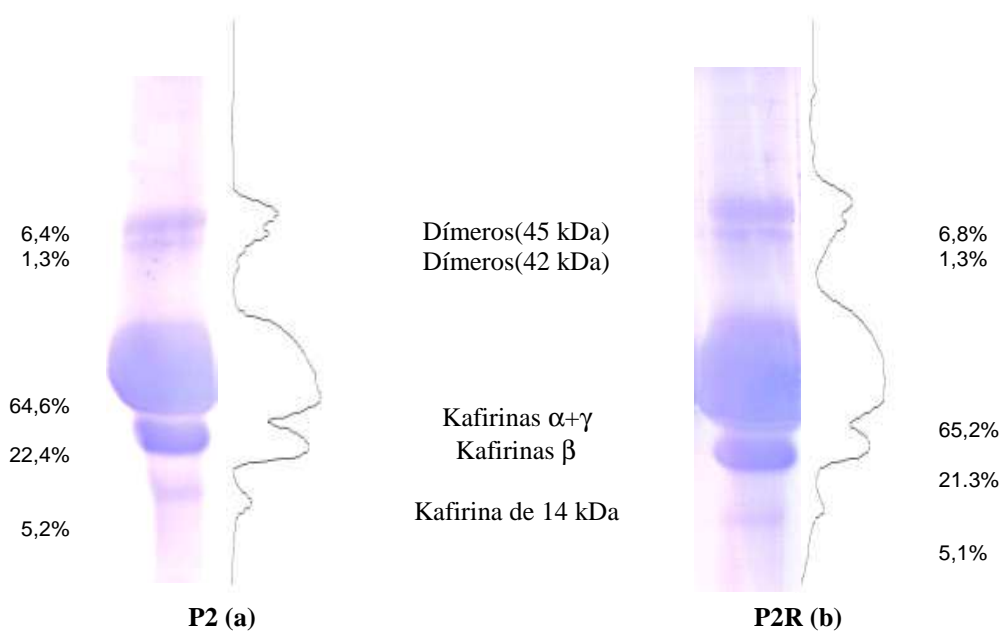


Fig. 15 - Perfil electroforético da amostra de **P2**, extraída a partir de farinha **não cozida** da variedade de sorgo **Kenyan Local White**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

O perfil electroforético das prolaminas 2 não apresenta os aglomerados de elevado peso molecular, uma vez que esta fracção é extraída com solução alcoólica (*terc*-butanol 60 %) na presença de agente redutor.

De acordo com resultados de SDS-PAGE com géis de acrilamida 15 % revelados com azul de Coomassie a fracção de prolaminas 2 da variedade de sorgo Kenyan Local White apresenta, uma proteína de peso molecular aparente de 45 kDa, uma outra de peso molecular inferior, cerca de 42 kDa, kafirinas α , γ e β e ainda uma proteína de 14 kDa.

As kafirinas α + γ constituem a fracção proteica mais abundante. A kafirina β e o polipéptido de 14 kDa estão presentes em quantidades superiores às da amostra de prolaminas 1 (Fig. 15 a).

Quando esta amostra é estudada na presença de agente redutor a sua composição, quer quantitativa quer qualitativa, é bastante semelhante. Isto indica que após extracção as proteínas constituintes desta fracção não sofreram oxidação. A presença da proteína não redutível de 45 kDa volta a confirmar-se. Em relação à proteína de 42 kDa presente em quantidades vestigiais também parece ser não redutível (Fig. 15 b).

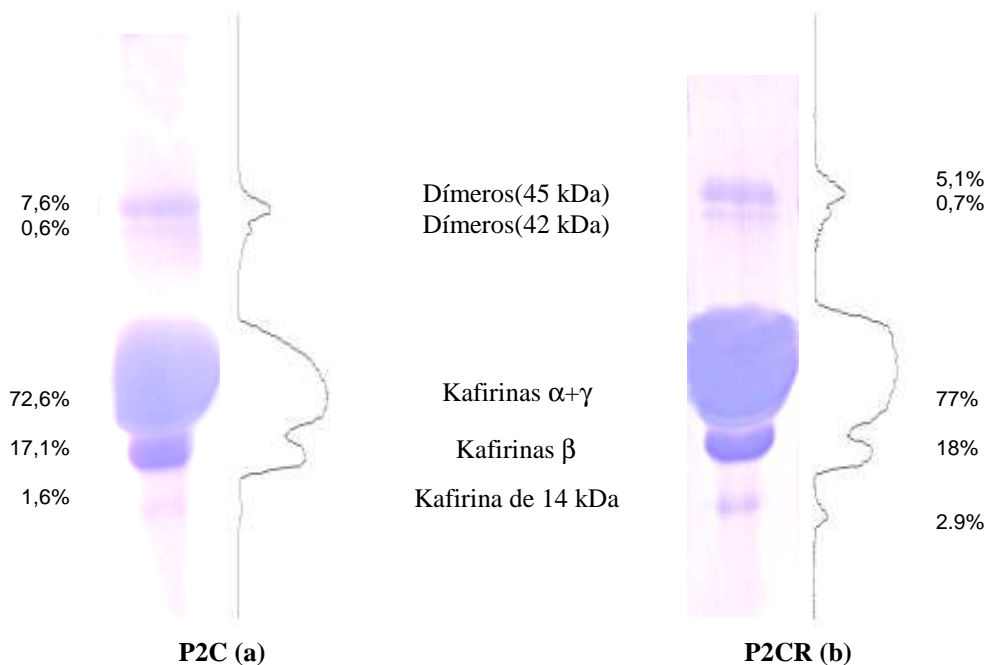


Fig. 16 - Perfil electroforético da amostra de **P2**, extraída a partir de farinha cozida da variedade de sorgo **Kenyan Local White**, (a) não reduzida e (b) reduzida.

No que diz respeito à fracção proteica de prolaminas 2 extraídas a partir de amostra de farinha cozida não se verificam grandes diferenças em relação às amostras de farinha

crua. Nesta variedade não se verifica o aparecimento de proteínas de elevado peso molecular com o cozimento. Este tratamento aplicado à farinha induz uma diminuição da quantidade de proteína de 42 kDa. Nota-se, também, a diminuição da quantidade da kafirina β e da proteína de 14 kDa, a quantidade das kafirinas α e γ é praticamente inalterada. O estudo desta fracção na sua forma reduzida não mostra diferenças significativas (Fig. 16 a e b).

O perfil electroforético destas amostras poderá indicar que as prolaminas referentes às amostras de sorgo Kenyan Local White serão menos afectadas com o cozimento do que as da variedade NK283. Uma vez que com o cozimento existe menos variação nos padrões electroforéticos nas amostras cozidas da variedade Kenyan Local White do que nas da variedade NK283.

2.1.5. Conclusões

Verificou-se que a fracção de prolaminas de sorgo é constituída por aglomerados de elevado peso molecular (superior a 97 kDa), trímeros (66 kDa), dímeros (45 kDa), kafirinas $\alpha + \gamma$ e kafirina β , tal como já tinha sido referido por El Nour *et al.* (1998).

Para além destas, na fracção de prolaminas da variedade Kenyan Local White, está presente um polipéptido de 14 kDa que, até à data, não se tinha detectado nesta fracção proteica. Não se elimina a possibilidade deste polipéptido estar presente na fracção de prolaminas da variedade NK283, mas em quantidades muito reduzidas.

Por redução, confirmou-se que os aglomerados de elevado peso molecular (superior a 97 kDa), os trímeros e os dímeros por kafirinas α , γ e β que estabelecem ligações S-S entre si, tal como referem El-Nour *et al.* (1998). Proceder-se-á à determinação da composição de cada um dos componentes isoladamente no capítulo III.4.

Este trabalho revela que na fracção de prolaminas extraídas a partir de amostras de farinhas cozidas estão presentes polipéptidos de 66 kDa e 45 kDa que não desaparecem com a redução. Isso indica que são constituídos por proteínas que não estabelecem pontes dissulfeto intermoleculares, mas outro tipo de ligações. Uma possibilidade pode ser o incremento das interacções de natureza hidrofóbica.

A formação dos referidos polipéptidos pode estar na base da diminuição dos valores de digestibilidade sentida por esta fracção proteica quando submetida a cozimento.

É verificado pela primeira vez o desaparecimento da kafirina β da fracção de prolaminas extraídas a partir de farinha cozida da variedade NK283. Este desaparecimento, para além de estar relacionado com a formação de aglomerados de elevado peso molecular na fracção de prolaminas está, também, relacionado com o aumento da fracção de glutelinas, uma vez que com o cozimento ela passa a fazer parte desta fracção.

As duas variedades de sorgo estudadas no decorrer deste trabalho apresentam algumas diferenças, no que diz respeito à fracção prolaminas.

Verificou-se que a fracção de prolaminas da variedade NK283 é mais afectada com o cozimento. Os perfis electroforéticos das prolaminas da variedade NK283 extraídas a partir de farinha cozida são significativamente distintos dos das prolaminas extraídas a partir de farinha crua. No que diz respeito às amostras de prolaminas da variedade Kenyan Local White a alteração dos perfis electroforéticos com o cozimento não é tão acentuada.

Os valores de digestibilidade determinados por Taylor *et al.* (1998) vêm de encontro aos resultados obtidos. Estes valores são de 23,6 % para a farinha de sorgo NK283 decorticada e de 24,8 % para a variedade de sorgo Kenyan Local White. Os valores de digestibilidade referentes a farinhas decorticadas cozidas diminuem acentuadamente em ambas as variedades, no entanto a maior diminuição faz-se sentir no caso da variedade NK283 (1,9 % para NK283 e 7,5 % para Kenyan Local White).

2.2. Caracterização das Prolaminas da Variedade NK283 por RP-HPLC

Na tentativa de estudar a hidrofobicidade da fracção de prolaminas 1 e 2 de sorgo e a alteração dessa característica com o cozimento procedeu-se ao fraccionamento das amostras de prolaminas 1 extraídas a partir de farinha crua e cozinhada da variedade de sorgo NK283 por RP-HPLC (Fig. 17).

Este ensaio utilizando RP-HPLC foi baseado em estudos de Sastry *et al.* (1986) e de Paulis e Bietz (1988). Os primeiros analisaram, por RP-HPLC, as prolaminas de sorgo e os segundos estudaram, também por RP-HPLC, a fracção de prolaminas de milho, ambos os grupos de investigadores não usaram mais que 57 % de acetonitrilo para a eluição das prolaminas. Neste trabalho, envolvendo prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinha de

sorgo NK283 crua e cozida, verificou-se que essa percentagem de acetonitrilo não é suficiente para a eluição das amostras. O fraccionamento começou a ocorrer com 67 % de acetonitrilo e só finalizou com 100 % de acetonitrilo. Por esta razão os programas de eluição desenvolvidos por Sastry *et al.* (1986) e de Paulis e Bietz (1988) foram modificados.

2.2.1. Separação de prolaminas P1 da variedade NK283 por RP-HPLC

Amostras de prolaminas 1 (P1), prolaminas 1 extraídas de farinha cozida (P1C), prolaminas 2 (P2) e prolaminas 2 extraídas de farinha cozida (P2C) foram analisadas por RP-HPLC.

Numa tentativa de identificar o tipo de proteína que origina os diferentes picos cromatográficos procedeu-se ao fraccionamento, por RP-HPLC, da amostra P1 da variedade NK283.

O fraccionamento foi realizado numa coluna analítica Waters RP C18 (300 Å, 15 µm, 300 mm x 3.9 mm d.i.), tendo sido necessário realizar 30 injeções para obter quantidade de proteína suficiente para se proceder a uma análise por SDS-PAGE em Phast-System. Uma vez que as quantidades obtidas foram reduzidas foi necessário recorrer a revelação com prata. Há que salientar que os géis do sistema de Phast-System não possuem uma resolução que permita uma diferenciação de proteínas de pesos moleculares muito próximos.

Os resultados da identificação dos polipéptidos obtidos encontram-se na Tab. 2.

Tab. 2 - Sumário dos resultados obtidos por RP-HPLC preparativo.

Tempo de retenção do pico (min)	% de acetonitrilo com a qual elui	Resultado da análise por SDS-PAGE
1,7 (1)	67,4	66 kDa, 45 kDa, α e γ
8 (2)	76,2	α ou γ
20 (4)	93	α ?
24 (5)	96	97 kDa, β e 14kDa
28 (6)	100	α ?

Os resultados de SDS-PAGE referentes ao pico que elui aos 1,7 minutos mostra uma banda a 66 kDa e uma outra que poderia corresponder a kafirinas γ e α . Outros estudos realizados com este mesmo tipo de amostras mostram que parece existir uma relação entre os agregados de 66 kDa e as kafirina γ (Duodu, 1999, resultados não publicados).

Aos 8, 20 e 28 minutos (picos 2, 4 e 6) eluem kafirinas que, de acordo com a electroforese, poderiam ser α e/ou γ . Há que ter presente que existem na fracção de prolaminas de sorgo dois tipos de kafirinas α que apresentam composição em aminoácidos bastante distinta e que consequentemente deverão apresentar diferentes hidrofobicidades. Este tipo de cromatografia separa as proteínas pela sua hidrofobicidade então, não seria de estranhar que as kafirinas α e γ fossem separadas em três picos bem distintos. Eventualmente poder-se-á estar a separar desta forma as kafirinas α_1 da α_2 e da γ . Se isto estiver a ocorrer na realidade é provável que os primeiros picos correspondam à kafirina γ e que os picos que saem mais tarde correspondam às kafirinas α . Segundo Shull *et al.* (1992) a kafirina α apresenta maior hidrofobicidade do que a kafirina γ , uma vez que as primeiras apresentam na sua composição maior percentagem de aminoácidos hidrofóbicos (fenilalanina, leucina e isoleucina) e a segunda apresenta maior percentagem de resíduos hidrofílicos (glicina e histidina). Uma vez que não se conhece a composição em aminoácidos dos dois tipos de kafirinas α isoladamente, poder-se-á supor que os dois tipos de kafirina α apresentam diferentes hidrofobicidades. Assim sendo no pico 6 eluirá a kafirina α mais hidrofóbica, no pico 4 a kafirina α de menor hidrofobicidade e no pico 2 a kafirina γ .

Aos 24 minutos (pico 5), eluem simultaneamente o polipéptido de 14 kDa, a kafirina β e aglomerados de elevados peso molecular (97 kDa). A presença da kafirina β nesta fracção cromatográfica é surpreendente, uma vez que segundo Shull, *et al.* (1992) a kafirina β é de natureza hidrofílica, devendo então eluir antes da kafirina α . Este facto poderá indicar que o polipéptido de 14 kDa e a kafirina β poderão encontrar-se a fazer parte de aglomerados de elevado peso molecular estabelecendo, possivelmente, ligações hidrofóbicas e que se libertam apenas aquando da electroforese, na presença de SDS.

Nenhum dos picos analisados apresenta absorvância a 280 nm, portanto nenhuma das fracções apresenta na sua composição polifenóis.

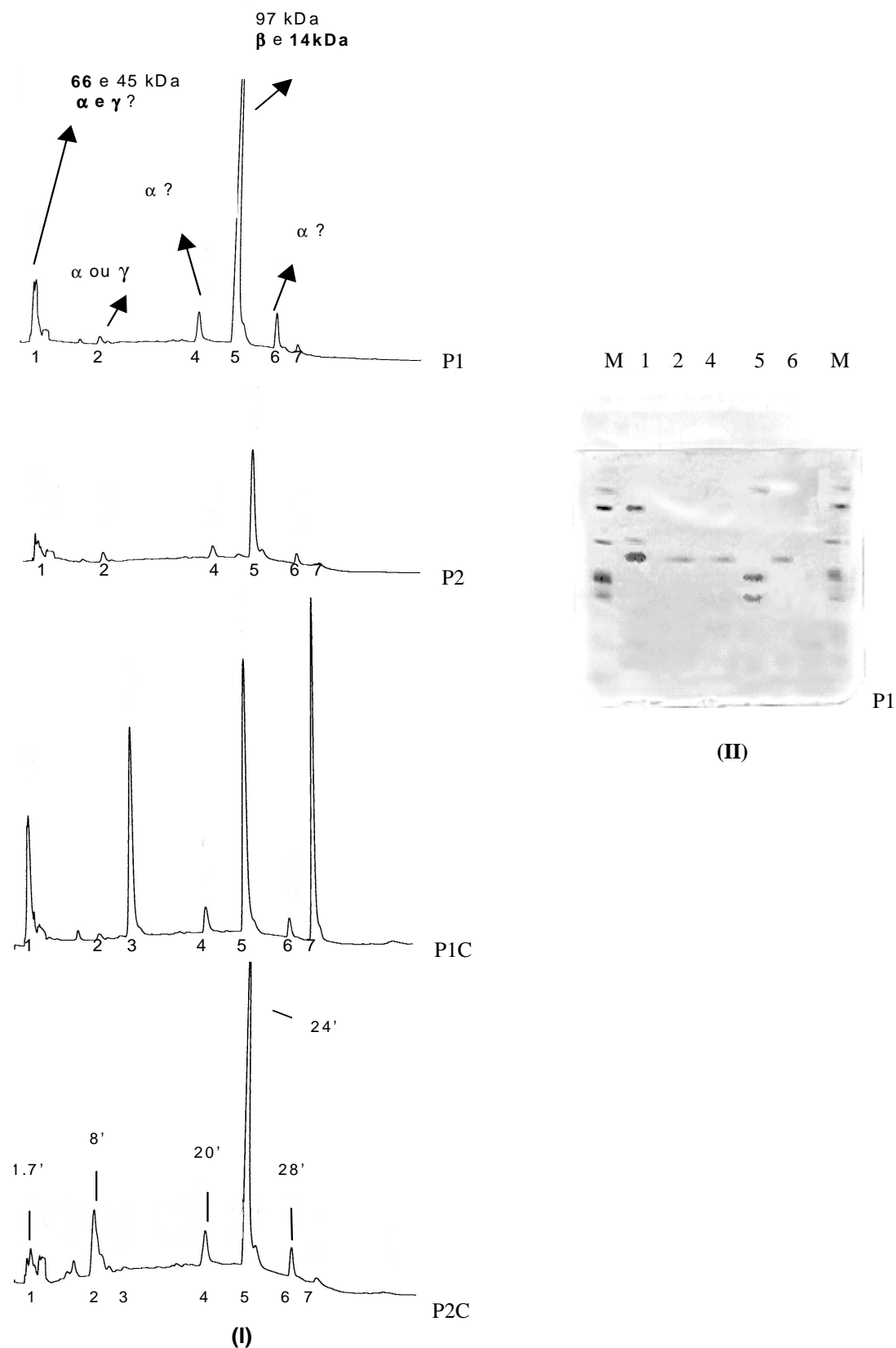


Fig. 17– (I) Cromatogramas de RP-HPLC (Merck 50983 Lichrospher 100 RP18) referentes às amostras P 1 e P2 extraídas a partir de farinha crua e cozida (detecção 210 nm com gradiente linear de 65 a 100 % de acetonitrilo durante 25 minutos) **(II)** Caracterização electroforética das fracções referentes à amostra P1.

2.2.2. Obtenção dos perfis cromatográficos das prolaminas da variedade NK283

Após caracterizadas as fracções cromatográficas da amostra P1 tentou transpor-se os resultados obtidos para a análise das restantes amostras de prolaminas.

Comparando o cromatograma correspondente à amostra P1 com o da amostra P2 (extraída em condições redutoras) nota-se um decréscimo evidente no pico que elui a 24 minutos (pico 5). Este pico, corresponde às prolaminas de peso molecular de 97 kDa, desaparece quando a amostra é tratada com agente redutor. O pico que elui a 1,7 minutos (pico 1) também diminui, a este tempo de retenção eluem da coluna as proteínas de 66 kDa.

O cromatograma correspondente à amostra P1C, para além de mostrar picos que nenhuma outra amostra apresenta (pico 3 a 12 min e pico 7 a 31 min), apresenta os picos que eluem a 1,7 (pico 1) e a 24 (pico 5) minutos mais intensos que no cromatograma correspondente à amostra P1. Este comportamento pode ser interpretado como o aumento de aglomerados de peso molecular mais elevado e o aparecimento de polipéptidos de hidrofobicidades diferentes. O pico que surge a 31 minutos (pico 7) parece comprovar que com o cozimento, para além de se formarem aglomerados de elevado peso molecular, induz o aparecimento de proteínas com características mais hidrofóbicas.

O cromatograma da amostra P2C assemelha-se ao da amostra P1 com a excepção de pico que elui a 8 minutos (pico 2) e da intensidade do pico que elui a 24 minutos (pico 5). Como foi verificado anteriormente esta amostra, mesmo sendo extraída em condições redutoras, apresenta na sua composição aglomerados irreduzíveis (de 66 e 45 kDa) como resultado do processo de cozimento da farinha (Fig. 17).

2.2.3. Conclusões e discussão

Com este trabalho verificou-se que o cozimento da farinha de sorgo, para além de promover um incremento de polipéptidos de elevado peso molecular, promove ainda o aparecimento de compostos de diferentes características hidrofóbicas.

Contudo não é possível afirmar que as fracções obtidas por RP-HPLC revelem o que de facto ocorre nas prolaminas com o cozimento. Os efeitos sentidos nos polipéptidos com

este tipo de cromatografia (tanto devido à interacção com o solvente como à acção da coluna) podem resultar em artefactos que não coincidam necessariamente com os resultados electroforéticos das amostras de prolaminas totais, antes do fraccionamento por RP-HPLC.

Comprovou-se, com este estudo que o polipéptido de 14 kDa está presente na fracção de prolaminas extraídas da variedade NK283.

No entanto este trabalho levantou duas suspeitas:

- Poderá existir uma relação entre as proteínas de 66 kDa e a kafirina γ e uma afinidade entre a kafirina β o polipéptido de 14 kDa e as proteínas de 97 kDa; estas indicações já tinham sido sugeridas por resultados anteriores (Capítulo III.2.1.1.).
- Os dois tipos de kafirina α poderão possuir hidrofobicidades distintas, sendo susceptíveis de separação por RP-HPLC. Poder-se-á obter resultados contundentes apenas quando confrontados com a composição em aminoácidos de cada uma destas kafirinas.

3. FRACCIONAMENTO DAS PROLAMINAS 1 DE DUAS VARIEDADES DE SORGO

O tipo de cromatografia empregue no capítulo III.2 revelou ser um processo de fraccionamento proteico extremamente moroso, uma vez que se utilizou uma coluna de RP-HPLC analítica. Para além do tempo necessário para obtenção de quantidades de proteína suficientes para a sua caracterização posterior, não se conhece o efeito da coluna (de natureza hidrofóbica) nem da concentração elevada de acetonitrilo (necessária para que ocorra eluição das prolaminas) sobre a amostra.

Tentou-se, então, outro tipo de cromatografia para fraccionamento da amostra de prolaminas 1 extraída de farinha de variedade NK283. Desta vez testou-se cromatografia de exclusão molecular (C.E.M.).

Em cromatografia de exclusão molecular as proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho molecular à medida que se vão difundindo através do material poroso (fase estacionária).

O fraccionamento, para posterior caracterização de proteínas, está entre os problemas mais complexos da bioquímica: as proteínas são heterogéneas, apresentam características de solubilidade inusuais e têm tendência a formar agregados quer covalentes quer não covalentes (Bietz, 1985).

3.1. Prolaminas 1 da variedade NK283

Para este ensaio cromatográfico foram utilizadas amostras de prolaminas 1 da variedade NK283 recebidas, previamente fraccionadas da Universidade de Pretória (África do Sul).

Um exemplo dos cromatogramas resultantes da C.E.M. desta fracção proteica, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M, está representado na figura seguinte (Fig. 18).

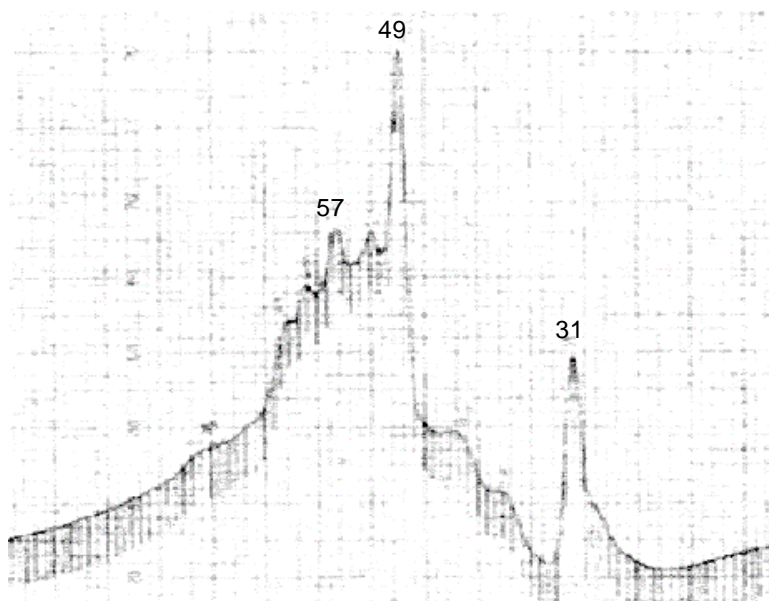


Fig. 18 - Cromatograma referente à C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.

Como se pode verificar pelo cromatograma apresentado na figura (Fig. 18) o fraccionamento da referida amostra originou 3 fracções principais. Cada uma dessas fracções está assinalada, no cromatograma (Fig. 18), no máximo de absorvância com os números **32**, **45** e **57**. A análise por SDS-PAGE serviu para verificar qual a composição das várias fracções obtidas pela cromatografia de exclusão molecular, nomeadamente, a composição das fracções que apresentam maior absorvância a 280 nm (Fig. 19).

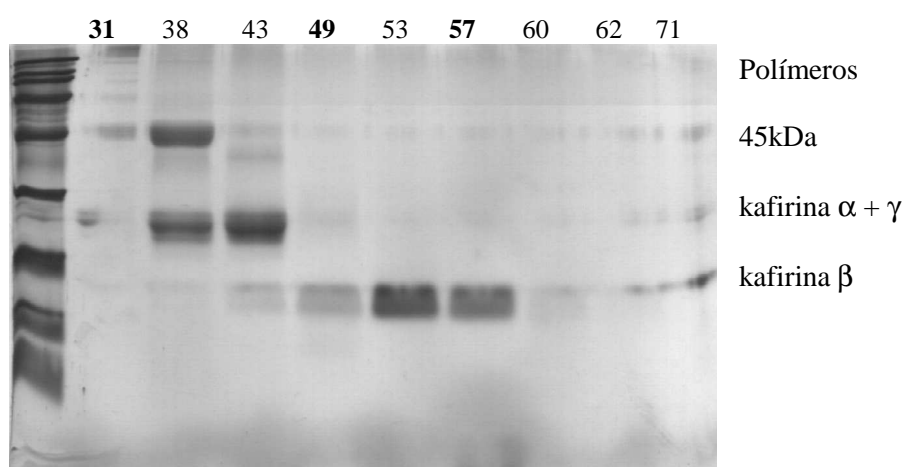


Fig. 19 - SDS-PAGE da principais fracções cromatográficas da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.

Como se pode verificar pelo gel apresentado na figura anterior (Fig. 19) a primeira fracção proteica (fracção **31**) a eluir da coluna de exclusão molecular é constituída por aglomerados de elevado peso molecular (> 97 kDa) e por uma pequena porção de proteína com 45 kDa. A fracção **38** é constituída pelo polipéptido de 45 kDa e pelas kafirinas $\alpha + \gamma$. A fracção 43, por sua vez, é constituída, maioritariamente, pelas kafirinas $\alpha + \gamma$, apresentando, também, vestígios da proteína de 45 kDa e por uma outra proteína de peso molecular inferior a esta. Das fracções **49**, **53** e **57** faz parte a kafirina β . As restantes fracções analisadas não apresentam ou apresentam pouca proteína.

Em resumo, o fraccionamento da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 resultou numa fracção com poucos aglomerados de elevado peso molecular, quando comparados com a quantidade de aglomerados presentes na amostra inicial (Fig. 7 a), numa fracção constituída por proteína de 45 kDa e pelas kafirinas $\alpha + \gamma$, por uma fracção constituída pelas kafirinas $\alpha + \gamma$ e por uma fracção construída pela kafirina β .

Após a análise da composição de cada uma das fracções e análise do cromatograma em si, pode verificar-se que o comportamento cromatográfico desta amostra é bastante peculiar. De imediato constata-se que ao máximo de absorvância a 280 nm, registado no cromatograma (Fig. 18), nem sempre corresponde o máximo da quantidade de proteína presente nessa fracção, como é o caso das fracções 31 e 49 (Fig. 19). Este fenómeno é referido na literatura sem, contudo, se adiantar uma explicação para o facto (Shull *et al.* 1992). Suspeitou-se que este comportamento poderia estar relacionado com a presença de polifenóis. Estas substâncias absorvem a 280 nm e parecem ligar-se preferencialmente à fracção de kafirinas β . Na fracção do cromatograma (Fig. 18) correspondente à eluição das kafirinas β (fracção 49-60) os valores de absorvância oscilam enquanto a quantidade de proteína que elui decresce progressivamente (Fig. 19).

Após liofilização das amostras verificou-se que o rendimento esperado para o fraccionamento não foi de forma alguma o esperado; ou seja, sabendo a quantidade de amostra aplicada na coluna e determinando a quantidade de material obtido (por pesagem) após fraccionamento e liofilização, verificou-se que estes valores ficam aquém dos esperados.

Para além da solubilidade desta fracção proteica, no eluente em causa, não ser muito satisfatória (o que significa que nem toda a amostra ficou em solução), verificou-se, também, que a amostra de prolaminas 1 da qual se partiu para o fraccionamento

apresentava polifenóis (verificado através do espectro de FTIR) (Fig. 24 a), assim como NaCl remanescente da extracção das albuminas e globulinas.

Uma vez que se suspeitou que os polifenóis podiam estar na origem da falta de solubilidade das proteínas procedeu-se à sua extracção prévia; antes da amostra ser submetida ao fraccionamento por exclusão molecular (Capítulo III.4).

3.2. Prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White

Para este ensaio cromatográfico foram utilizadas amostras de prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White recebida, previamente fraccionada, da Universidade de Pretória (África do Sul).

O cromatograma resultante da C.E.M. da fracção de prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M, está representado na figura seguinte (Fig. 20).

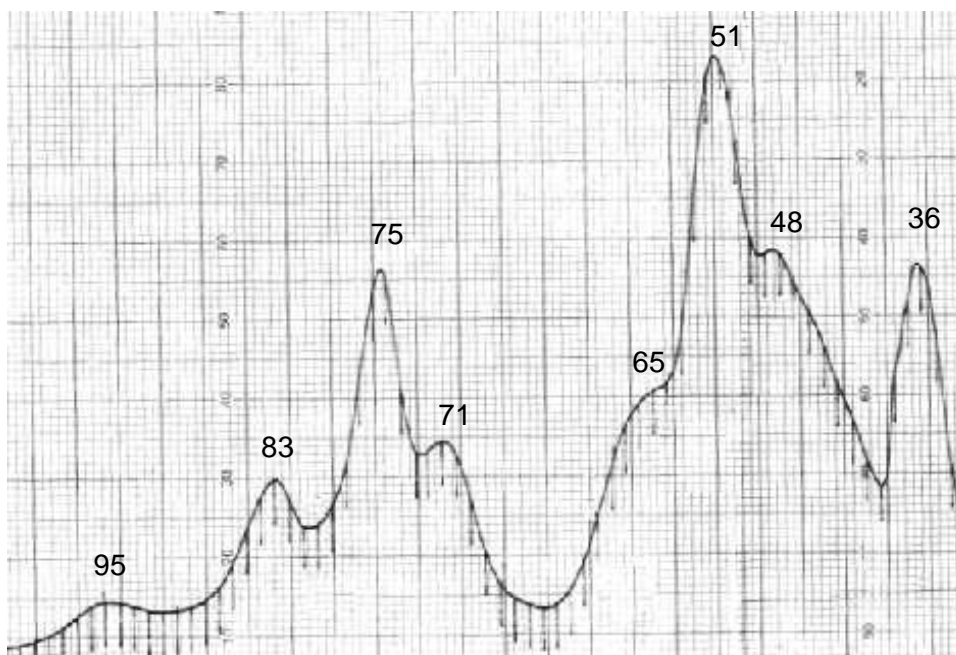


Fig. 20 - Cromatograma referente à cromatografia de exclusão molecular da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.

Como se pode verificar o perfil cromatográfico da fracção de prolaminas 1 desta variedade de sorgo é bastante distinto do perfil cromatográfico da correspondente fracção

proteica da variedade NK283. Após uma breve análise ao cromatograma (Fig. 20) pode concluir-se que, com esta amostra, se obtiveram mais fracções cromatográficas. Desta vez obtiveram-se, aparentemente, 8 fracções cromatográficas. Uma vez que os picos do cromatograma não estão bem definidos houve necessidade em analisar, por SDS-PAGE, fracção por fracção, ou seja tubo por tubo (Fig. 20).

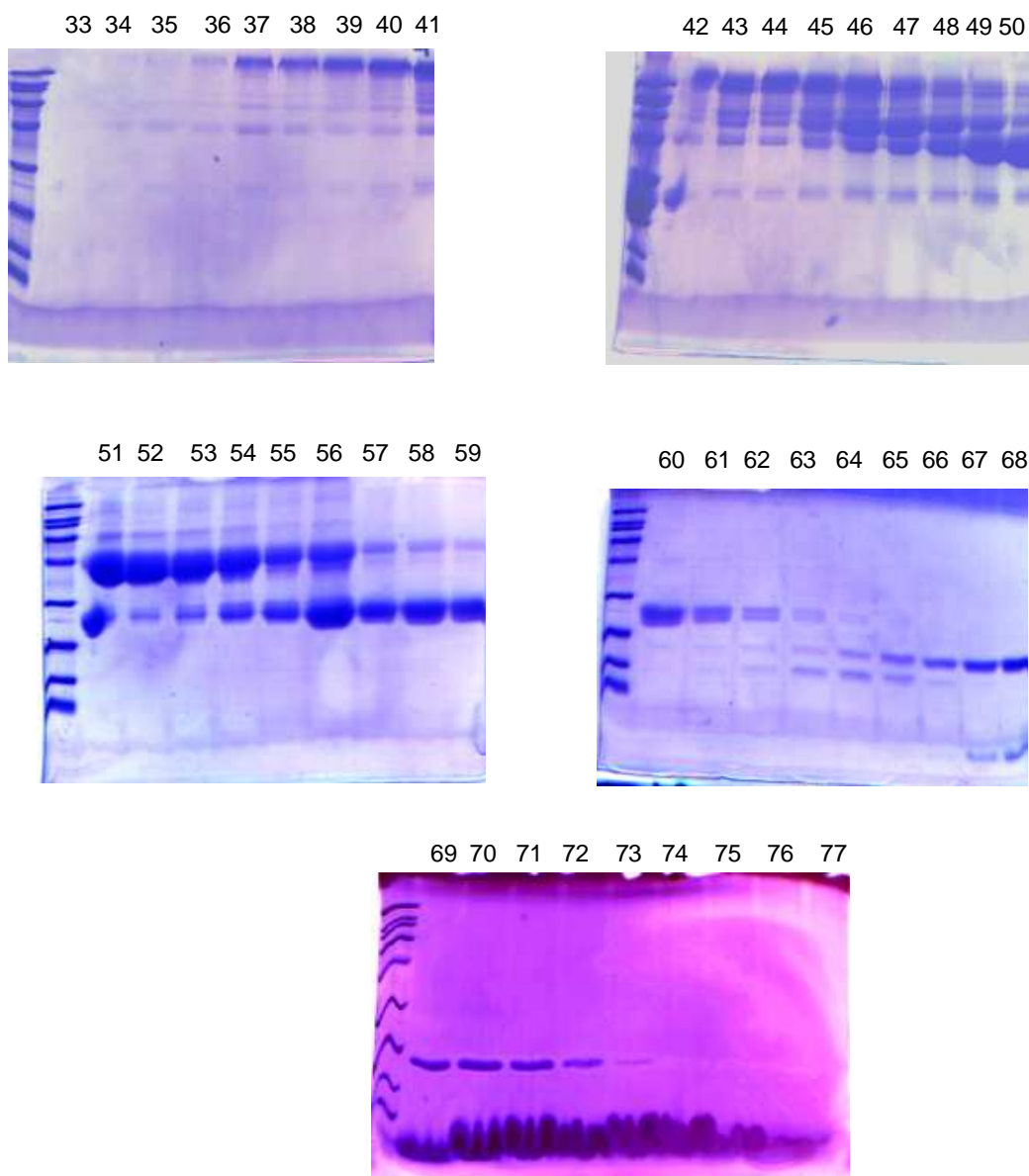


Fig. 21 - SDS-PAGE das fracções cromatográficas da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M.

A caracterização electroforética (Fig. 21) das diversas fracções cromatográficas revelou um fraccionamento razoável. Inicialmente eluíram os aglomerados de elevado peso molecular, depois, juntamente com estes começou a eluir a proteína de 45 kDa. Em seguida esta proteína começou a eluir em conjunto com as kafirina $\alpha + \gamma$, depois, as fracções apresentavam apenas a kafirina $\alpha + \gamma$, em seguida eluiu a kafirina β sem nenhuma outra proteína. Por fim eluiu a kafirina β juntamente com uma proteína de peso molecular aproximado de 14 kDa. Oportunamente abordar-se-á o facto de por vezes em conjunto com a banda correspondente à kafirina β e no final da cromatografia, surgir uma banda de contorno irregular presente na zona inferior do gel. A partir do tubo 77 não se detectou, por SDS-PAGE, a eluição de nenhuma outra fracção.

Após uma série de separações cromatográficas e dos vários conjuntos de fracções estarem dialisados e liofilizados, as amostras obtidas foram, de novo, analisadas por SDS-PAGE. O gel resultante desta análise é apresentado na figura seguinte (Fig. 22).

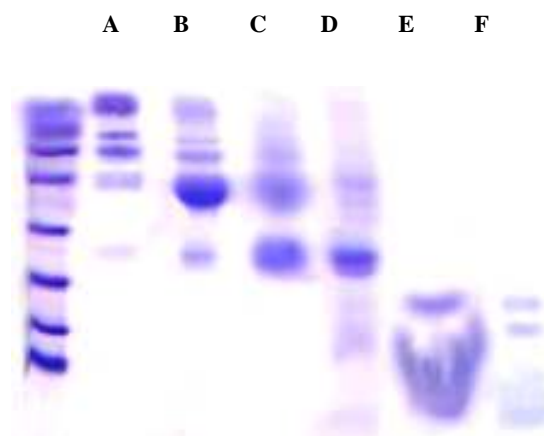


Fig. 22 - SDS-PAGE das fracções finais da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade Kenyan Local White, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. **A** - aglomerados de elevado peso molecular + 45 kDa; **B** - fracção enriquecida com 45 kDa; **C** - 45 kDa + kafirina $\alpha + \gamma$; **D** - fracção enriquecida com kafirinas $\alpha + \gamma$; **E** - kafirina β + polifenóis; **F** - kafirina β + 14 kDa.

Em resumo, após fraccionamento da fracção de prolamina 1 da amostra Kenyan Local White obtiveram-se 6 fracções principais:

- fracção constituída por aglomerados de elevado peso molecular e a proteína de 45 kDa (A);
- fracção enriquecida na proteína de 45 kDa (B);

- fracção constituída pela proteína de 45 kDa e pela kafirina $\alpha + \gamma$ (C);
- fracção enriquecida em kafirina $\alpha + \gamma$ (D);
- fracção com kafirina β com polifenóis (E). A presença de polifenóis foi revelada pelo espectro de FTIR desta fracção (Fig. 33, Capítulo III.7);
- fracção pela kafirina β e pela proteína de 14 kDa (F).

O rendimento obtido, após C.E.M. da fracção de prolaminas 1 desta variedade de sorgo, foi bastante bom e a recuperação de proteínas das diferentes fracções foi razoável. Este rendimento pode ser devido ao facto de, previamente à aplicação na coluna cromatográfica, desta amostra se ter solubilizado mais facilmente no eluente, do que a correspondente amostra da variedade NK283. Na linha de raciocínio seguida até então e de acordo com a literatura este facto parecia sugerir que a variedade sorgo Kenyan Local White possuiria menos compostos polifenólicos susceptíveis de ocasionar entre-cruzamentos, comparativamente a variedade N283.

3.3. Conclusões

O comportamento cromatográfico das prolaminas 1 da variedade NK283 e da variedade Kenyan Local White, em coluna de exclusão molecular com resina Sephacryl S-100 e com fase móvel etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M, é completamente distinto. Para além do fraccionamento das proteínas desta última variedade ser mais eficiente o rendimento cromatográfico é também superior.

A solubilidade de ambas as amostras na referida fase móvel é significativamente distinta. As prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White são mais fáceis de solubilizar. Pensa-se que este facto poderá estar relacionado com a quantidade de polifenóis que cada uma das variedades apresenta.

Na fracção de prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White foi detectada uma proteína de peso molecular aparente de 14 kDa, que até à data nunca tinha sido referida como fazendo parte das prolaminas de sorgo.

Os polifenóis parecem estar associados preferencialmente à kafirina β .

4. REMOÇÃO DE POLIFENÓIS DAS PROLAMINAS 1 DA VARIEDADE NK283

Para remoção dos polifenóis da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 foram testados vários métodos: extracção com solventes orgânicos, diálise na presença de SDS e cromatografia de exclusão molecular usando como eluente ureia e SDS.

4.1. Extracção com solventes orgânicos

O primeiro tratamento aplicado para remoção de polifenóis envolveu extracção com água:acetona:éter etílico (6:14:10 v/v/v) (Terril *et al.*, 1992). Este tratamento para além de não eliminar muito eficazmente os polifenóis, remove parte da proteína.

4.2. Diálise na presença de SDS

Por análise dos géis de SDS-PAGE revelados com Coomassie verifica-se que os polifenóis são separados das proteínas durante a electroforese (Fig. 23). Este facto sugeriu que o SDS pode ser em parte responsável pela referida dissociação. Então, testaram-se dois métodos, ambos envolvendo SDS.

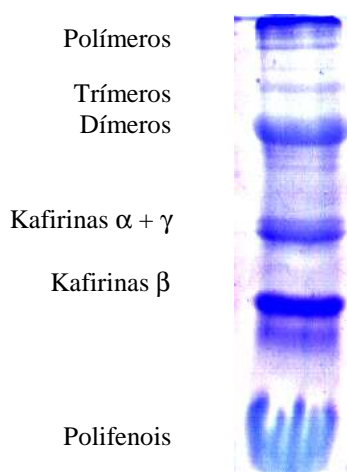


Fig. 23 - SDS-PAGE de uma amostra de prolaminas 1 de sorgo apresentando, na sua composição, polifenóis.

O tratamento aplicado envolvendo diálise da amostra de prolaminas, após esta ser solubilizada em ureia 3 M e SDS 1% (m/v), em membranas de diálise de limite de exclusão de 3 kDa, mostrou-se pouco eficiente para remoção dos compostos fenólicos, uma vez que se verificou, por FTIR, através do pico a 1737 cm^{-1} , que grande parte dos polifenóis permanece com a proteína (Fig. 24).

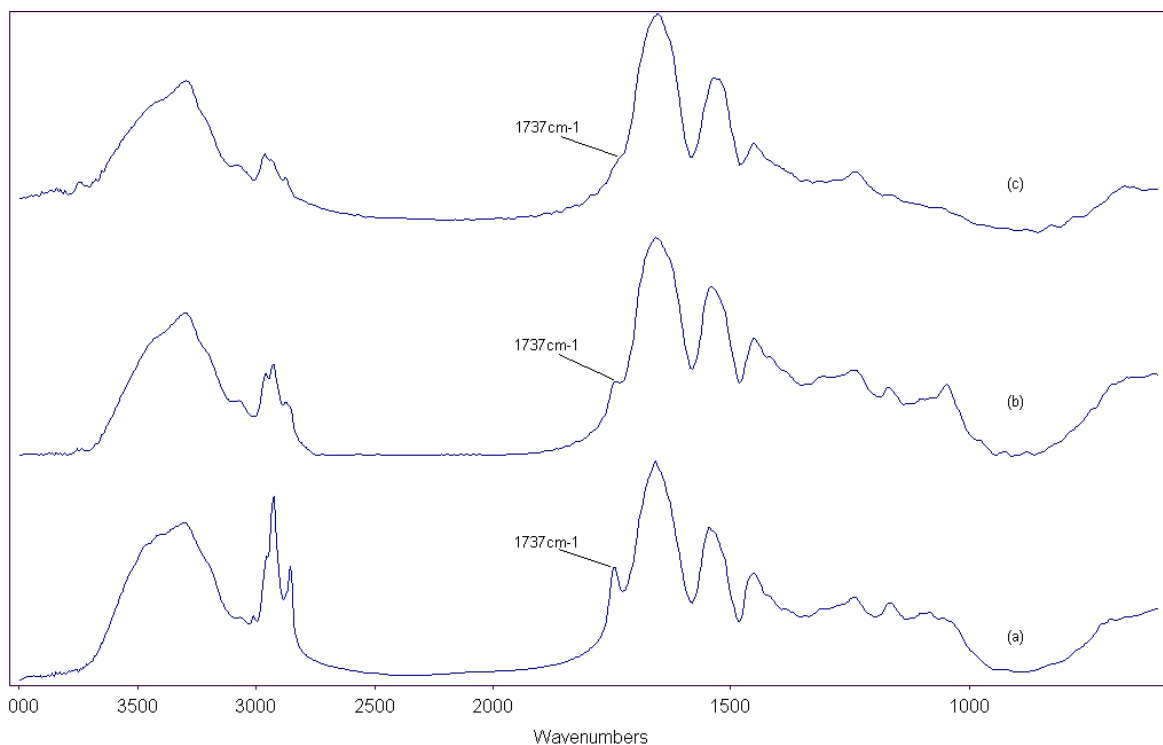


Fig. 24 - Espectros de FTIR das amostras de proteína **(a)** antes do tratamento para remoção de polifenóis **(b)** após tratamento com diálise e **(c)** após tratamento por C.E.M. Ambos os tratamentos envolveram SDS.

4.3. C.E.M. usando ureia e SDS como eluente

Com o tratamento cromatográfico da amostra, em coluna Saphacryl S-100 utilizando, como eluente, ureia 3 M e SDS 1 % (m/v) obteve-se um cromatograma com um pico mais intenso e outros de menor intensidade que eluem posteriormente (Fig. 25).

A ureia serviu para aumentar a solubilidade da amostra, enquanto que o SDS serviu (tal como referido no ponto anterior) para promover a dissociação entre polifenóis e proteínas.

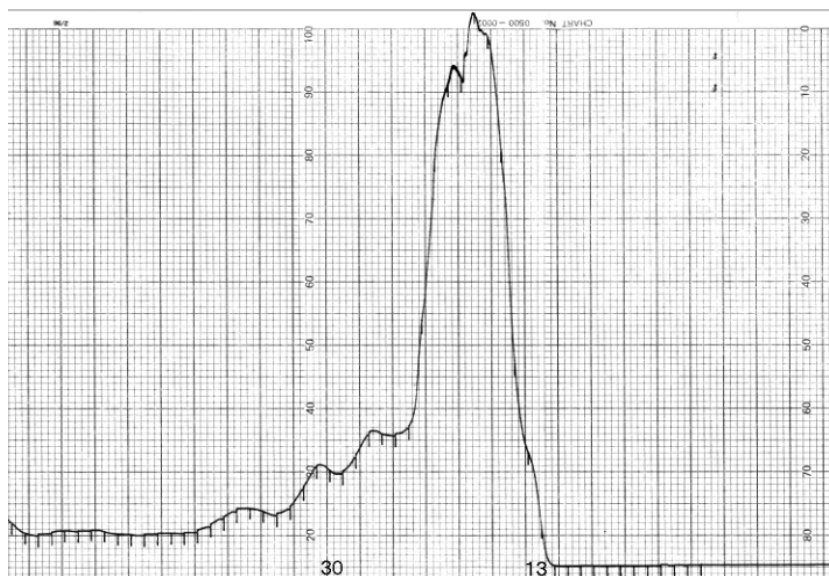


Fig. 25 - Cromatograma referente à C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v).

Verificou-se por SDS-PAGE que com C.E.M. os polifenóis permanecem na coluna durante mais tempo (correspondem aos picos menos intensos do cromatograma). A proteína, por sua vez, elui em primeiro lugar (corresponde ao pico mais intenso do cromatograma) sem sofrer fraccionamento significativo (Fig. 25).

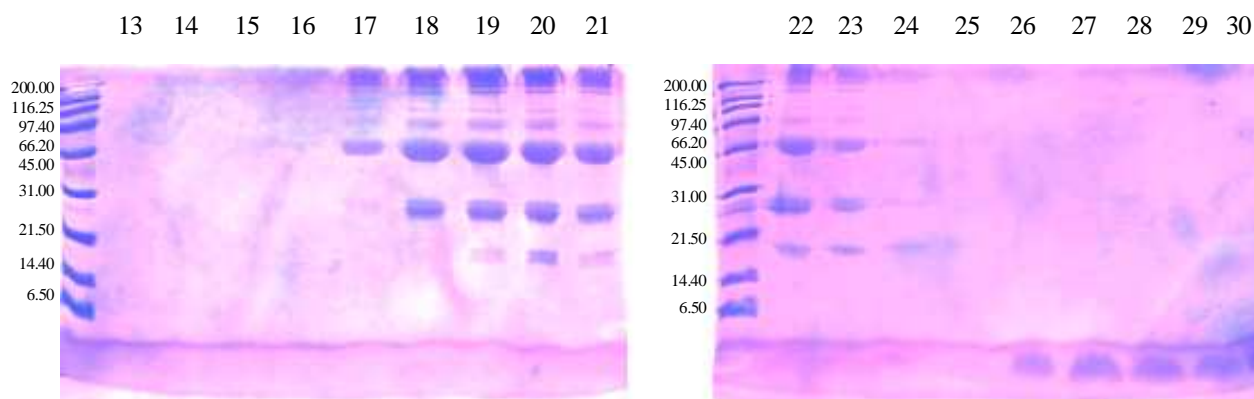


Fig. 26- SDS-PAGE das fracções da C.E.M. da amostra de prolamina 1 da variedade NK283, numa coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v).

A presença de polifenóis pode ser detectada no géis de SDS-PAGE (Fig. 26), pelo aparecimento de uma banda de contornos irregulares presente na zona do gel correspondente a valores de R_f mais elevados, ou seja, de peso molecular inferior.

Após terem sido removidos os compostos fenólicos à prolamina 1 e desta ter sido dialisada e liofilizada, tornou-se de tal forma insolúvel em etanol, *tert*-butanol 60 %, ureia 8 M com ou sem agente redutor, que não se conseguiu efectuar o seu posterior fraccionamento.

Este facto confirma a hipótese de que os compostos polifenólicos poderão estar envolvidos no processo de solubilização de prolaminas, contudo, contrariamente ao que seria de esperar, promovendo a sua solubilização.

Analizando os espectros de FTIR da amostra de prolamina 1 da variedade NK283 após o tratamento que envolve diálise e após o tratamento que envolve cromatografia de exclusão molecular, ambos na presença de SDS, podemos saber qual dos tratamentos foi mais eficiente na remoção de polifenóis (Fig. 24).

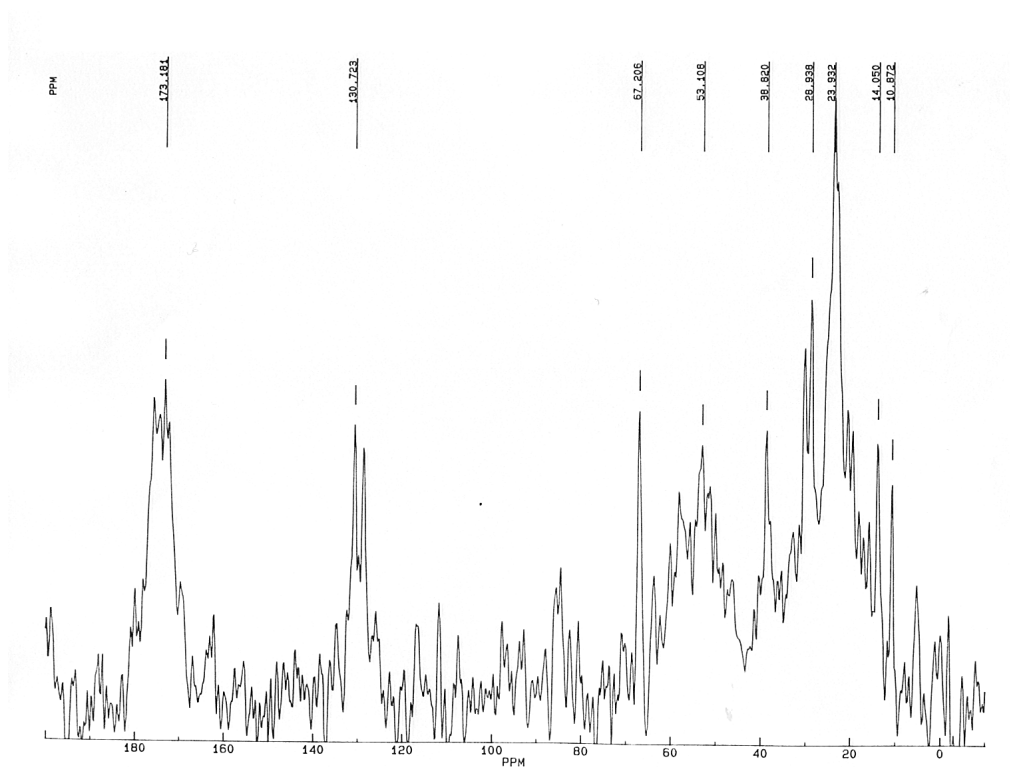
Como se pode verificar pela análise dos espectros o pico a 1737 cm^{-1} é significativamente inferior no espectro c da Fig. 24 o qual corresponde à amostra de proteína submetida a remoção de compostos fenólicos por C.E.M. em coluna de Sephacryl S-100 usando como eluente ureia 3 M com SDS 1 % (m/v).

Estes resultados foram confirmados por RMN de estado sólido.

4.3.1. RMN

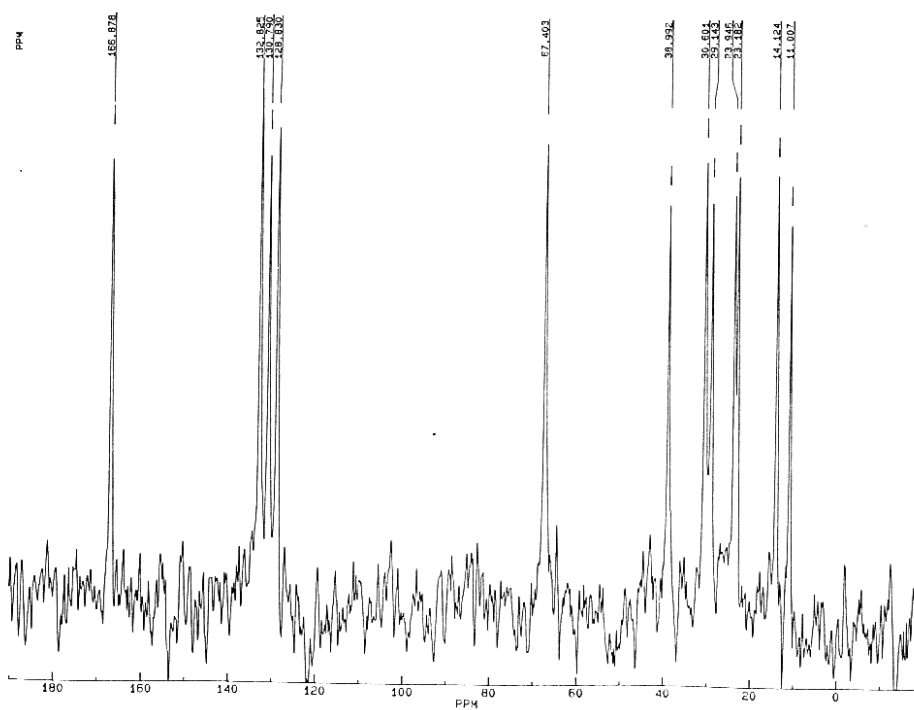
Foram efectuados ensaios de C-single pulse (SPE), CP-MAS e ^1H -MAS às amostras de prolamina 1 da variedade NK283 antes e após tratamento cromatográfico de remoção de polifenóis por cromatografia em coluna de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-100 eluída com ureia 3 M e SDS 1 %.

O espectro de CP-MAS (Fig. 27 a) das prolaminas antes do tratamento cromatográfico apresentou uma relação sinal/ruído indicadora de elevada mobilidade do sistema. A presença de picos estreitos na região aromática ($\sim 130\text{ ppm}$) sugere a presença de grupos fenólicos. A referida mobilidade é confirmada pelos espectros de SPE (Fig. 27 b). Ao longo de todo o espectro estão presentes picos estreitos e muito resolvidos, incluindo na região aromática. O espectro de próton MAS (Fig. 27 c) confirma a presença de grupos aromáticos na região 7-8 ppm.



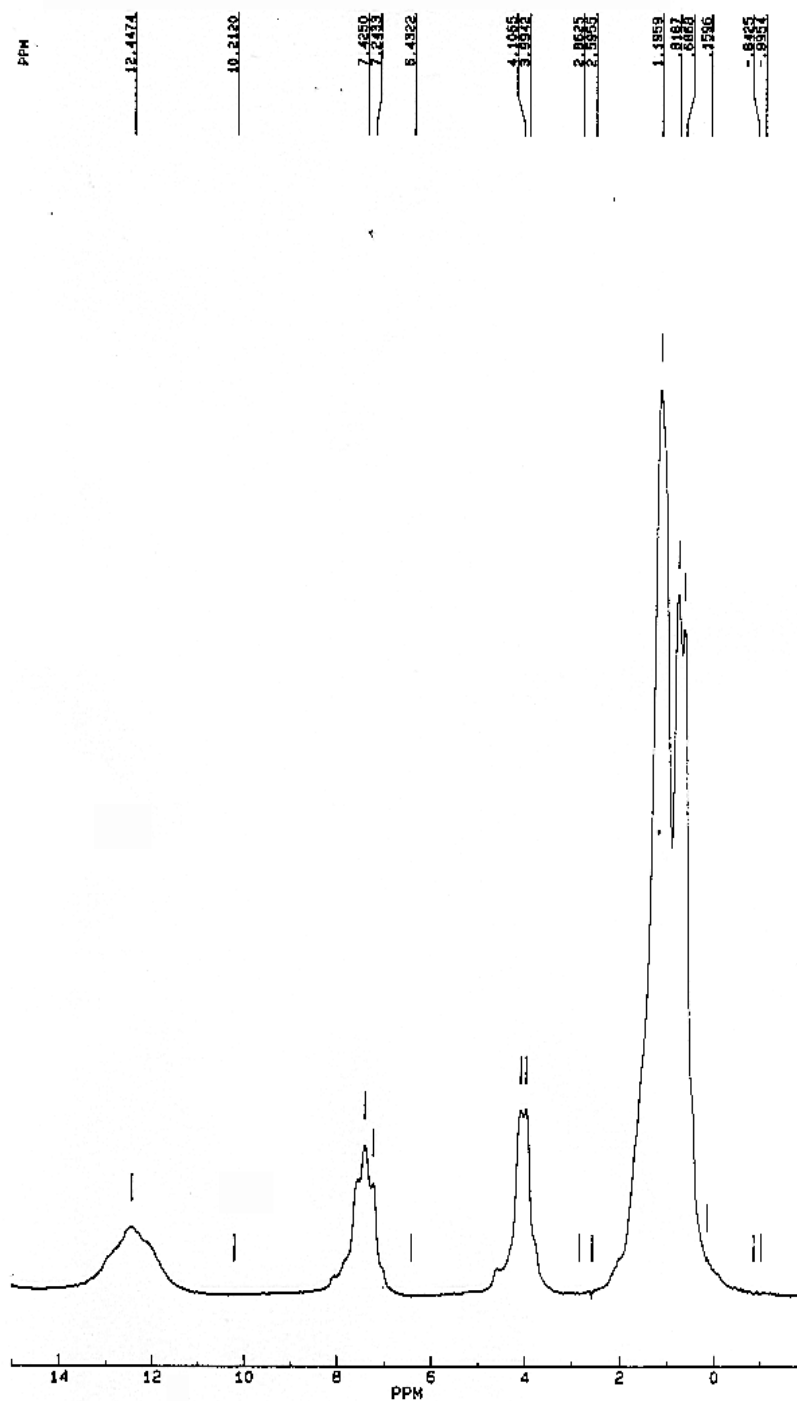
VR 4,5 kHz; NA 100; LB 50

(a)



VR 4,5 kHz; NA 400; LB 30

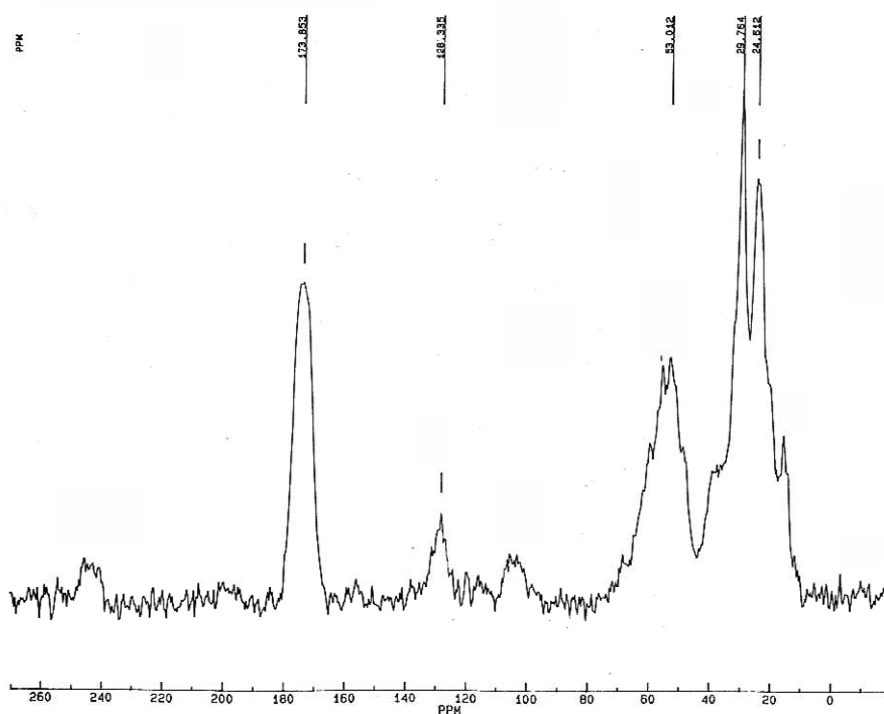
(b)



VR 4,5 kHz; NA 84

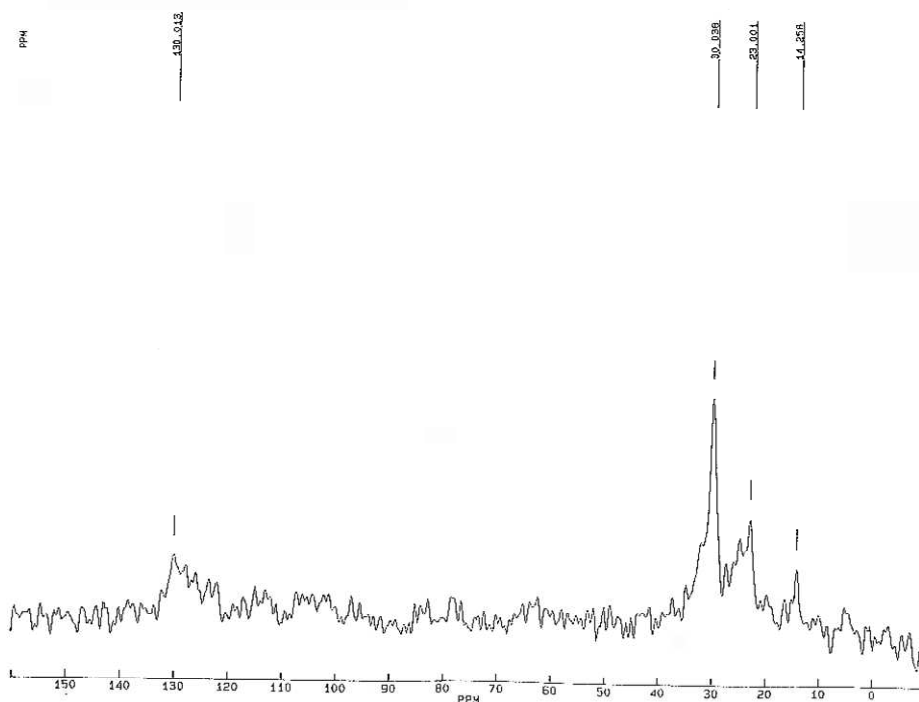
(c)

Fig. 27 - Espectros de RMN no estado sólido da amostra de prolamina 1 da variedade NK283 antes do tratamento cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3 M e SDS 1 % (m/v). (a) CP MAS; (b) SPE; (c) ^1H -MAS.



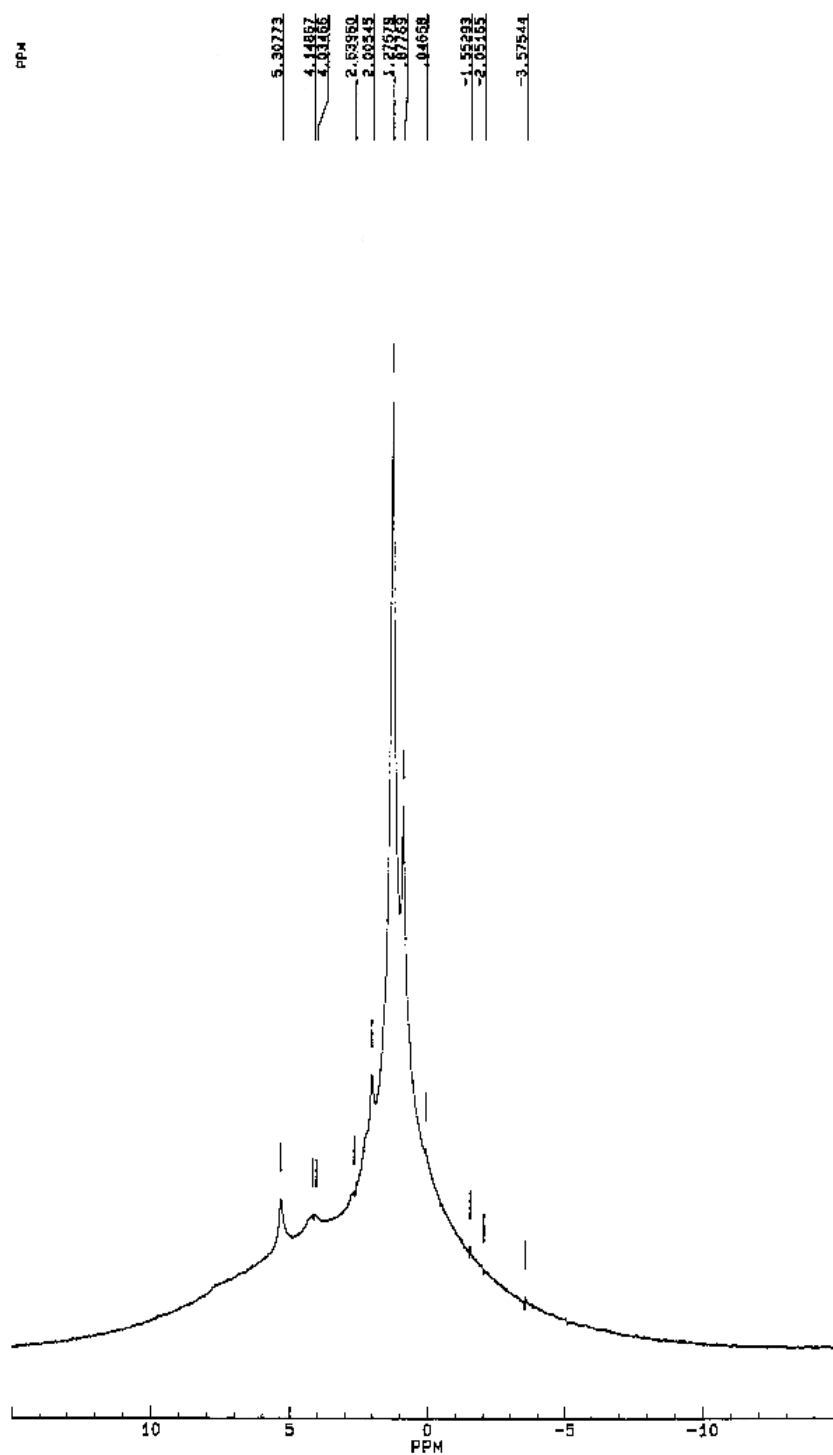
VR 7 kHz; NA 1376; LB 30

(a)



VR 4,5 kHz; NA 712; LB 30

(b)



VR 14 kHz; NA 40

(c)

Fig. 28 - Espectros de RMN no estado sólido da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 após do tratamento cromatográfico em coluna de Sephacryl S-100 utilizando como eluente ureia 3M e SDS 1% (m/v). (a) CP MAS; (b) SPE; (c) ^1H -MAS.

No que diz respeito à amostra após remoção dos polifenóis, o seu espectro de CP MAS (Fig. 28 a) apresenta uma razão sinal/ruído superior que no caso anterior e nota-se, simultaneamente, um decréscimo significativo dos picos por volta de 130 ppm. Isto indica a remoção dos polifenóis infere uma maior rigidez ao sistema. Este facto é confirmado no espectro de SPE (Fig. 28 b). O espectro de protão MAS (Fig. 28 c) mostra picos resolvidos sobre um componente largo o qual é indicador de um sistema mais rígido, ou seja, um sistema de menor mobilidade.

4.4. Conclusões e discussão

Por espectroscopia de Infravermelho de Transformadas de Fourier (FTIR) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) verificou-se a presença de compostos polifenólicos associados às fracções de prolaminas que são removidos por tratamentos com SDS.

Parte das ligações entre polifenóis e proteínas parecem ser de natureza hidrofóbica, visto serem destruídas na presença de SDS. Oh *et al.* em 1980, em estudos realizados com polipéptidos de síntese, verificaram que parte das ligações entre polifenóis e proteínas pode estabelecer-se hidrofobicamente.

Contrariamente ao que seria de esperar devido ao papel que é atribuído na literatura aos polifenóis no sorgo, os resultados sugerem que os polifenóis contribuem para a solubilização das prolaminas. Para verificar este facto foi solicitado à Universidade de Pretória (quem forneceu as amostras) informação sobre a presença de polifenóis nas duas variedades, tendo sido confirmado que a variedade Kenyan Local White, cujas prolaminas são mais facilmente dissolvidas, apresenta maior conteúdo de polifenóis (Taylor, 1999, resultados não publicados).

Uma vez que a amostra de prolaminas deixa de ser solúvel quando os polifenóis são totalmente removidos, estes compostos parecem estar de facto relacionados, com as características de solubilidade das proteínas. Os compostos polifenólicos estão localizados em zonas da proteína que apresentem características hidrofóbicas e de conformação flexível (com capacidade de adquirirem a conformação de 'pockets'). Estes compostos evitam o estabelecimento de certas ligações intra e intermoleculares proteína-proteína (Spencer *et al.* 1988 e Yan *et al.* 1995). Quando os polifenóis são removidos

poder-se-ão estabelecer ligações proteína-proteína extremamente fortes e que dificultem a sua solubilização. Após remoção dos polifenóis foi de facto impossível a dissolução das prolamínas quer com ureia 8 M quer na presença de agentes redutores (β -mercaptoetanol e DTT).

As amostras de prolamínas que apresentam no seu perfil electroforético uma banda de contorno irregular na zona inferior do gel de SDS-PAGE, apresentam no respectivo espectro de FTIR um pico a 1737 cm^{-1} indicador da presença de dicetonas vicinais, resultado da oxidação dos polifenóis. Os espectros de RMN apresentam igualmente picos indicadores da presença de compostos aromáticos pequenos de elevada mobilidade.

Pode inferir-se que a técnica de SDS-PAGE com revelação com Coomassie, pode servir como um bom teste para detectar a presença / ausência de polifenóis neste tipo de amostras.

5. ABORDAGEM AO PROBLEMA DA DIMINUIÇÃO DE DIGESTIBILIDADE DAS PROLAMINAS COM COZIMENTO

Uma vez que o fraccionamento das proteínas por cromatografia de exclusão molecular não foi bem sucedido e visto que todos os constituintes da fracção de prolaminas estão relativamente bem separados nos géis de SDS-PAGE, tentou-se o método de SDS-PAGE semi-preparativo desenvolvido por Watterson *et al.* (1993).

Este método aplicou-se às amostras de prolaminas 1 extraídas a partir da farinha crua da variedade NK283 e as prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinhas cozidas das variedades de sorgo NK283 e Kenyan Local White. As diversas amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida. Após a separação electroforética os géis foram revelados com Coomassie, as bandas correspondentes aos diferentes polipéptidos foram cortadas e as proteínas nelas contidas extraídas em condições redutoras. As fracções assim obtidas, foram novamente analisadas, desta vez por SDS-PAGE no Phast System. Os resultados do segundo ensaio electroforético estão representados na figura seguinte (Fig. 29).

Na tabela seguinte (Tab. 3) estão sistematizados os resultados da análise electroforética dos polipéptidos obtidos por SDS-PAGE semi-preparativa (apresentados na Fig. 29).

De acordo com os resultados da segunda análise por SDS-PAGE da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 as proteínas de peso molecular superior a 97 kDa, as de 66 kDa e as de 45 kDa são polímeros formados pelas kafirinas $\alpha + \gamma$ estabelecendo ligações por pontes de dissulfeto. Segundo El Nour, *et al.* (1998) os polímeros (peso molecular superior a 97 kDa), para além de kafirinas $\alpha + \gamma$ apresentam, também kafirina β . No presente estudo a presença desta proteína não foi detectada. A zona do gel indicadora da presença de polifenóis foi também submetida a SDS-PAGE preparativa. Os resultados mostram que a proteína de 14kDa está associada à presença destas substâncias na fracção de prolaminas (Fig. 29).

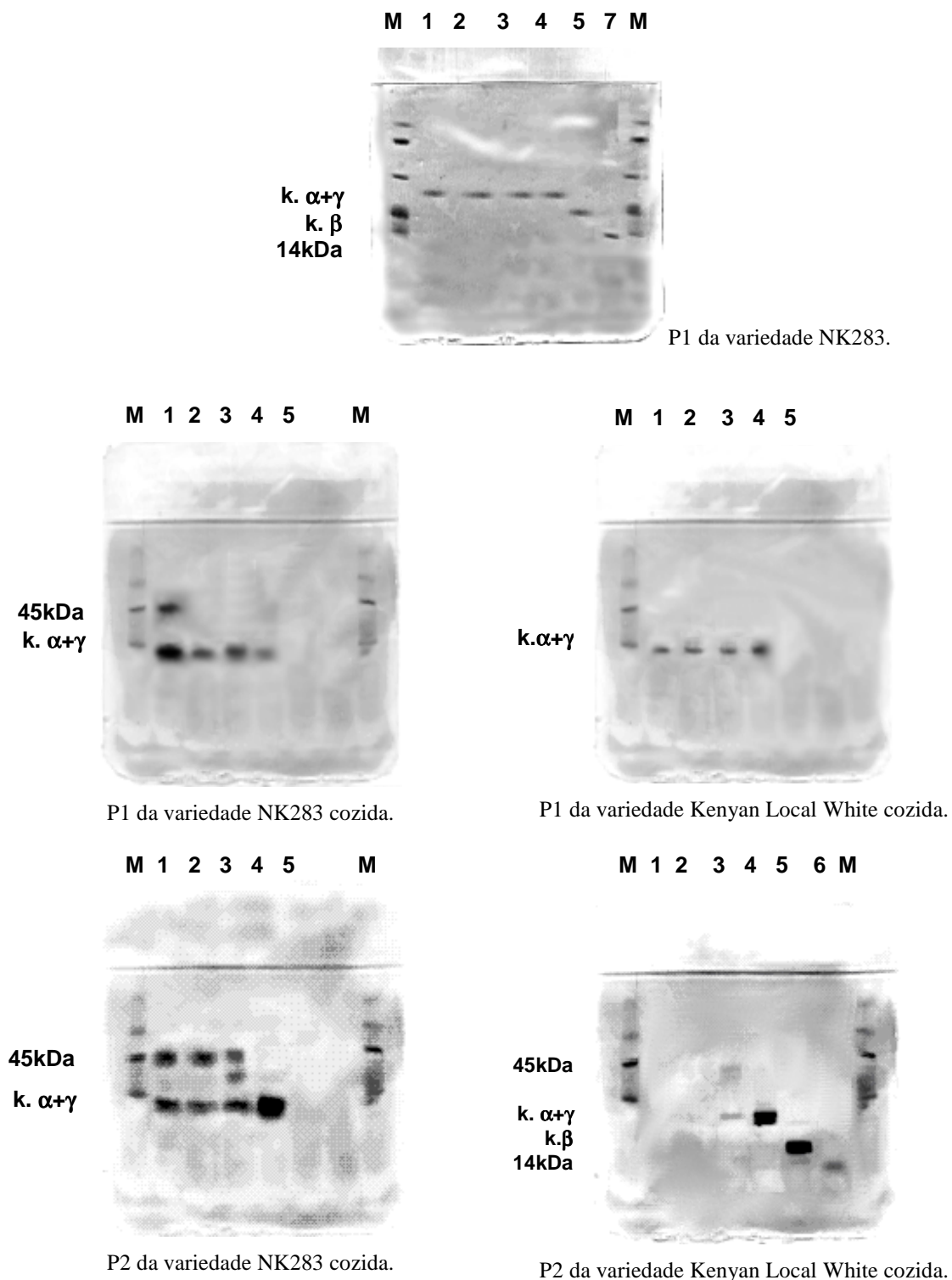


Fig. 29 - Composição dos polipéptidos obtidos por SDS-PAGE preparativa da amostra de prolaminas 1 da variedade NK283 e das amostras de prolaminas 1 e 2 das farinhas cozidas variedades NK283 e Kenyan Local White. As fracções apresentadas são referentes a: **1** - aglomerados de elevado peso molecular, superior a 97 kDa; **2** - proteína de 66 kDa, **3** - proteína de 45 kDa; **4** - kafirinas $\alpha+\gamma$, **5** - kafirina β , **6** - proteína de 14 kDa e **7**-polifenóis.

Tab. 3 – Composição dos polipéptidos obtidos por SDS-PAGE preparativa.

Bandas do gel	97kDa	66kDa	45 kDa	$\alpha+\gamma$	β	14 kDa	Polifenóis
Amostras	1	2	3	4	5	6	7
P1 NK283 Não cozida	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	β	**	14kDa
P1 NK283 Cozida	45kDa, $\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	**	**	**
P2 NK283 Cozida	45kDa, $\alpha+\gamma$	45kDa, $\alpha+\gamma$	45kDa, $\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	**	**	**
P1 Local White Cozida	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	*	**	**
P2 Local White Cozida	*	*	45kDa $\alpha+\gamma$	$\alpha+\gamma$	β	14kDa	**

* No gel original a proteína correspondente a esta banda está presente em quantidade reduzida;

** O gel original não apresenta a banda correspondente a essa proteína.

Os *aglomerados de pesos moleculares superiores a 97 kDa* das prolaminas 1 e 2, extraídas a partir das farinhas cozidas da variedade NK283 libertam, nas condições redutoras empregues nesta análise, para além de kafirinas $\alpha + \gamma$, dímeros de 45 kDa. No caso das mesmas amostras da variedade de sorgo Kenyan Local White os resultados são distintos. Os aglomerados de elevado peso molecular (> 97 kDa) das prolaminas 1 dão origem apenas a kafirinas $\alpha + \gamma$ e não se observa a presença dos dímeros. As prolaminas 2 não apresentam uma quantidade relevante de aglomerados de elevado peso molecular, não tendo sido possível determinar a sua composição.

Os *trímeros* (66 kDa) das prolaminas 1, extraídas a partir de farinha cozida, de ambas as variedades de sorgo, são constituídos pelos monómeros (kafirina $\alpha+\gamma$). As correspondentes prolaminas 2 da variedade NK283 para além de apresentarem na sua composição as kafirinas $\alpha + \gamma$ apresentam, também, os dímeros de 45 kDa. O gel original das prolaminas 2 da variedade Kenyan Local White não apresentava quantidade apreciável da proteína de 66kDa, sendo difícil determinar a sua composição.

Parte dos *dímeros* (45 kDa), das amostras de prolaminas 2 das farinhas cozidas, de ambas as variedades de sorgo estudadas, parece não ser susceptível de redução; após redução uma parte desta proteína é dissociada nos seus monómeros constituintes (kafirinas $\alpha + \gamma$), enquanto que outra parte permanece inalterada.

Para confirmar os resultados apresentados anteriormente foi efectuada Ureia-PAGE de todas fracções proteicas provenientes da electroforese semi-preparativa. Para esta análise as amostras foram concentradas (não secas) por corrente de azoto e reduzidas com DTT. O procedimento foi semelhante ao utilizado para SDS-PAGE mas tanto o “running” como o “staining” gel apresentavam na sua composição 8 M de ureia.

A Fig. 30 apresenta o gel de Ureia-PAGE dos polipéptidos de elevado peso molecular (> 97 kDa) e dos trímeros (66 kDa) das prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinha cozida da variedade NK283 cujo perfil não coincidiu com os resultados obtidos pela segunda análise de SDS-PAGE.

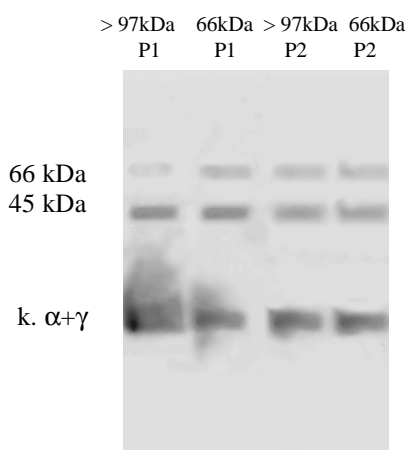


Fig. 30 - Resultados de Ureia-PAGE das fracções correspondentes aos polipéptidos de > 97 kDa e 66 kDa das prolaminas 1 e 2 (P1 e P2) extraídas a partir de farinha cozida das variedades NK283.

As quatro amostras em causa apresentam a mesma composição: 66 kDa, 45 kDa e kafirinas $\alpha+\gamma$. Estas proteínas, que se observam nas amostras cozidas, não são desagregadas nem sequer na presença de ureia. A diferença que estas amostras apresentam no gel de ureia em comparação com os géis de SDS é o aparecimento do polipéptido de 66 kDa, o qual não era observado nas amostras antes de serem concentradas. Isto significa que, mesmo em baixas concentrações, os trímeros não susceptíveis de redução encontram-se na composição de todas as amostras cozidas.

Os polipéptidos de 66 kDa e 45 kDa provenientes das fracções de polipéptidos de peso molecular superior a 97 kDa e dos polipéptidos de 66 kDa referentes as amostras de prolaminas 1 e 2 de farinha cozida, não são susceptíveis a redução na presença de DTT nem de desagregação na presença de ureia. Tudo indica que as ligações, referidas

anteriormente, não são originadas em pontes dissulfeto e também não são ligações de natureza hidrofóbica, uma vez que não são quebradas pela presença de ureia.

Conclusões e discussão

As kafirinas $\alpha+\gamma$ são os monómeros constituintes dos polímeros, trímeros e dímeros das prolaminas extraídas a partir de amostras de farinha da variedade NK283 crua. El Nour *et al.* (1998) detectaram a presença de pequenas quantidades kafirina β na composição dos aglomerados de elevado peso molecular. Apesar de no trabalho aqui apresentado não ter sido detectada a presença desta kafirina na composição de polímeros (> 97 kDa), a sua presença não é excluída. Nos resultados apresentados no Capítulo III.2.1. verifica-se que, após redução das amostras, a quantidade de kafirina β é incrementada. Este polipéptido deve, portanto, entrar na composição dos polímeros. Há que salientar que no referido ensaio a fracção de prolaminas é estudada como um todo (redução conjunta de polímeros, trímeros e dímeros) e não se sabe concretamente qual a fracção responsável pelo incremento da banda relativa à kafirina β .

Quando a farinha é cozida em água o perfil electroforético das prolaminas é alterado. Para além dos monómeros (kafirinas $\alpha+\gamma$) aparecem dímeros de 45 kDa e em alguns casos trímeros de 66 kDa indissociáveis quer na presença de DTT quer na presença de ureia. Como estes polipéptidos aparecem exclusivamente em amostras de prolaminas extraídas a partir de farinhas de sorgo cozida, a sua presença poderá, em parte, justificar a diminuição de digestibilidade das proteínas de sorgo aquando do cozimento. Poder-se-á explicar, desta forma, o facto de Hamaker *et al.*, em 1987, não terem conseguido recuperar os valores de digestibilidade da farinha crua em farinha cozida, tratada com agente redutor.

No capítulo III.2.2. verificou-se que os polifenóis eluem da coluna de exclusão molecular juntamente com as proteínas de peso molecular mais reduzido. O gel de SDS-PAGE referente à amostra de prolaminas da variedade NK283 (Fig. 29) revela a associação da proteína de 14 kDa aos polifenóis. É necessário verificar a presença, nesta proteína, de prolina ou de outro aminoácido com capacidade de estabelecer ligação a compostos polifenólicos.

6. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO DE PROLAMINAS POR FTIR

Numa primeira fase efectuaram-se espectros das pastilhas de KBr referentes às fracções de prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinha da variedade NK283 e da variedade Kenyan Local White, quer crua quer cozida. Os espectros obtidos por FTIR não mostram diferenças significativas entre eles.

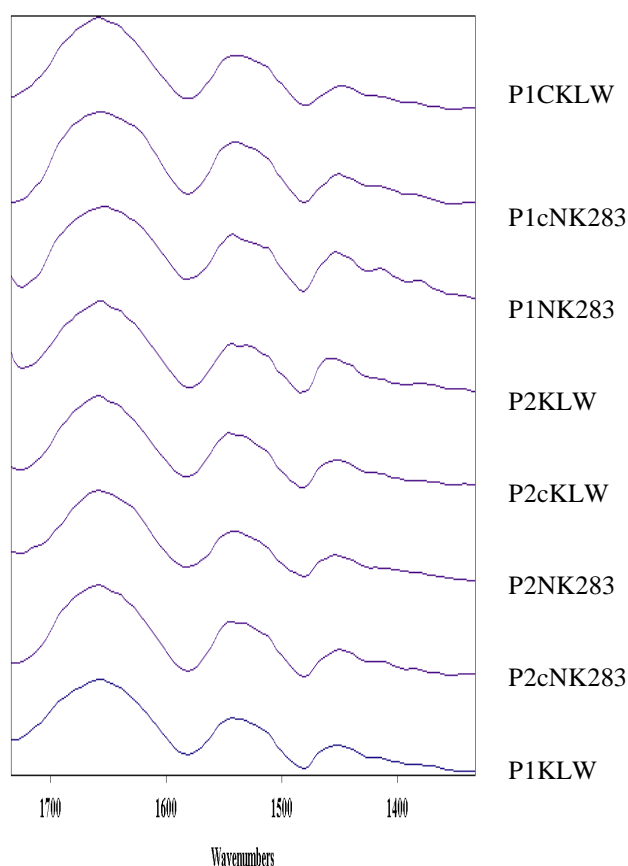


Fig. 31 - Espectros de FTIR das amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas de farinha crua e de farinha cozidas as variedades NK283 e Kenyan Local White.

Aplicou-se, então, análise de componentes principais (PCA) de modo a verificar se os espectros continham informação suficiente para permitir distinguir as amostras.

Por análise de componentes principais verificou-se que existe uma diferença entre o conjunto de amostras de prolaminas extraídas a partir de farinha crua e o conjunto de prolaminas extraídas a partir de farinha cozida (Fig. 34, Anexo I).

No entanto os resultados referentes à distinção não foram muito satisfatórios. Para a distinção das amostras de prolaminas (Fig. 35 Anexo I) extraídas a partir de farinha cozida contribui principalmente a presença de triglicéridos e a conformação proteica que dá origem à conformação de amida I. Para as amostras extraídas a partir de farinha crua contribui, principalmente, a conformação proteica que origina o pico correspondente à amida III e a presença de amido. Para a extração destas amostras, contrariamente às extraídas a partir de farinha cozida, não foi empregue tratamento prévio com α -amilase. Não é de estranhar que em conjunto com estas amostras seja removido alguma quantidade de amido.

Numa segunda fase estudou-se, utilizando a mesma metodologia, as fracções obtidas por fraccionamento da fracção de prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White utilizando cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M (capítulo III 3.1.).

Cada uma das fracções obtidas por C.E.M., nas condições descritas anteriormente, foi analisada por FTIR sob a forma de pastilhas de KBr. Alguns dos espectros parciais ($1750 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) obtidos estão representados na figura seguinte (Fig. 32).

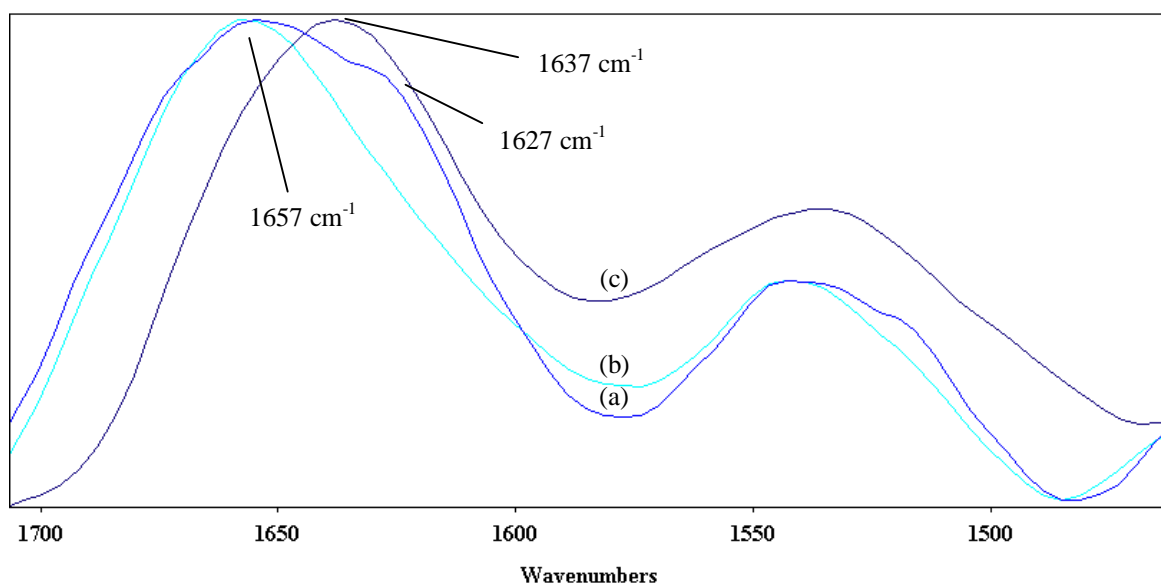


Fig. 32 - Espectros parciais referentes às amostras obtidas por fraccionamento com C.E.M. resina Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. **(a)** fracção rica em aglomerados de elevado peso molecular (corresponde à fracção A da Fig. 23); **(b)** fracção enriquecida na proteína de 45 kDa (corresponde à fracção B da Fig. 23) e **(c)** fracção constituída principalmente pela kafirina $\alpha+\gamma$ (corresponde à fracção E da Fig. 23).

No espectro referente à fracção proteica enriquecida em kafirina $\alpha + \gamma$ o máximo correspondente à amida I está localizado a 1637 cm^{-1} (espectro a da Fig. 32). Quando se trata de fracções nas quais estas kafirinas estão associadas formando aglomerados de elevado peso molecular ou dímeros o máximo da banda correspondente a amida I desloca-se ligeiramente para a esquerda, ou seja, para números de onda mais elevados (1657 cm^{-1}) (espectros a e b Fig. 32). Portanto pode verificar-se uma deslocação do máximo da banda correspondente à amida I de 1637 cm^{-1} para 1657 cm^{-1} ocasionada pela aglomeração dos monómeros (neste caso $\alpha + \gamma$).

Quando se compara o espectro correspondente à fracção proteica enriquecida em aglomerados de elevado peso molecular com o espectro da fracção proteica enriquecida na proteína de 45 kDa pode verificar-se que no espectro daquela está presente um ombro, bastante perceptível a 1627 cm^{-1} (espectro a da Fig. 32). Este ombro poderá estar relacionado com a presença de kafirina β , como se pode verificar pela análise dos espectros seguintes (Fig. 33).

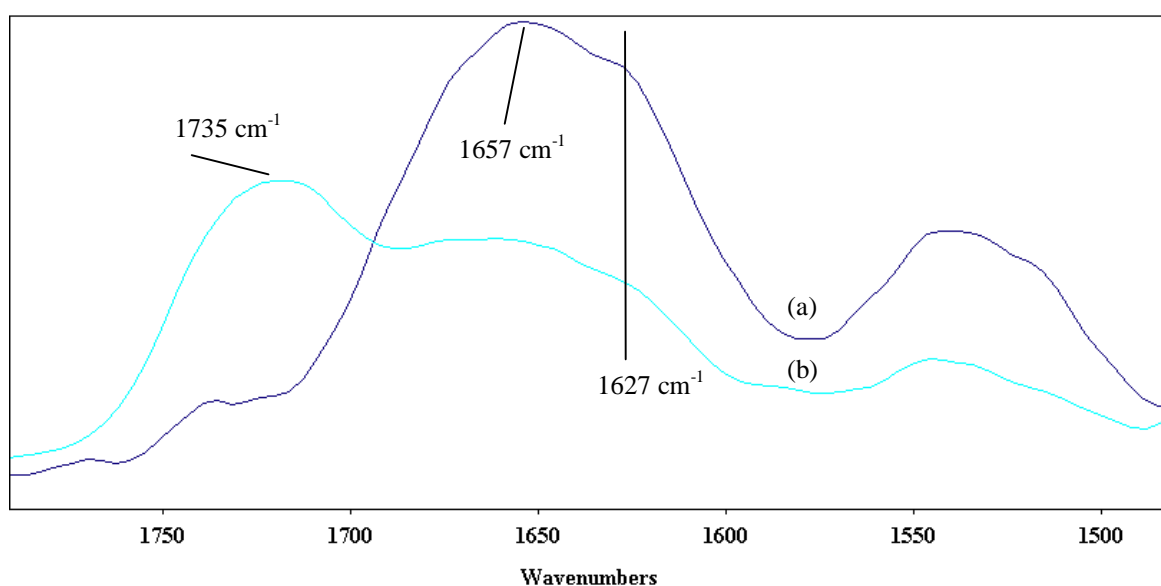


Fig. 33 - Espectros parciais referentes às amostras obtidas por fraccionamento com C.E.M. resina Sephacryl S-100 utilizando como eluente etanol 80 %, TFA 0,16 M e NH_4HCO_3 0,25 M. (a) fracção rica em aglomerados de elevado peso molecular (corresponde à fracção A da Fig. 23); (b) fracção enriquecida na kafirina β e contendo polifenóis (corresponde à fracção D da Fig. 23).

Nesta figura pode observar-se o espectro de uma fracção enriquecida em kafirina β e que apresenta polifenóis (espectro b da Fig. 33). O pico a 1735 cm^{-1} é característico de

dicetonas vicinais resultante da oxidação de polifenóis. Estão ainda presentes um máximo a 1657 cm^{-1} e um ombro a 1627 cm^{-1} . Este ombro coincide com o ombro presente nos aglomerados de alto peso molecular (espectro a da Fig. 33). Pode especular-se que este ombro nos aglomerados de alto peso molecular estivesse relacionado com a presença de kafirina β .

Tendo como referência os resultados deste trabalho e o de El Nour, *et al.* (1998), segundo os quais os aglomerados de alto peso molecular possuem pequenas quantidades de kafirina β , contrariamente aos dímeros; pode pensar-se que o ombro a 1627 cm^{-1} poderá ser indicador da presença de kafirina β na composição dos aglomerados. Como já foi mencionado anteriormente o espectro dos dímeros (45 kDa), que não possuem kafirina β , não apresentam dito ombro.

Por se tratar de ensaios efectuados com amostras enriquecidas nos diferentes polipéptidos e não com amostras puras, os resultados apresentados neste capítulo não passam de preliminares. No entanto, vindo a confirmar-se que a formação de aglomerados dá origem a deslocamentos dos máximos, e que por sua vez, os diferentes polipéptidos apresentam espectros característicos, esta técnica poderá ser de grande valor no estudo da formação de polímeros de kafirinas.

Conclusões

Com estes estudos, preliminares, das fracções proteicas por FTIR não se pretendeu efectuar uma atribuição exaustiva a cada banda dos espectros, porque como foi mencionado anteriormente as amostras não estavam completamente purificadas. Pretendeu-se sim localizar as bandas correspondentes à presença do compostos polifenólicos e as bandas correspondentes a amida I e amida II.

Observou-se que o máximo de absorvância da banda correspondente à amida I das kafirinas α e γ desloca-se ligeiramente para maiores números de onda quando ocorre aglomeração.

A presença de kafirina β nos aglomerados de alto peso molecular parece ser perceptível pela presença de um ombro a aproximadamente 1627 cm^{-1} .

Caso se confirmem estes factos com amostras de kafirinas com maior grau de purificação, poder-se-ia utilizar o FTIR para analisar modelos de misturas de kafirinas purificadas e monitorizar a sua aglomeração em função do tratamento térmico.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

“To be absolutely certain about something, one
must know everything or nothing about it.”
Olin Miller

"Judge a person by their questions rather than by their answers."
Voltaire

A fracção de prolaminas das duas variedade de sorgo estudadas (NK283 e Kenyan Local White) apresentam comportamento de solubilidade, cromatográfico e electroforético distintos. No que diz respeito ao seu comportamento face ao tratamento térmico verificaram-se, também, algumas diferenças. A fracção de prolaminas da variedade de sorgo NK283 parece ser mais afectada com o cozimento, uma vez que o seu comportamento electroforético face a este processamento é alterado mais drasticamente do que o das prolaminas da variedade Kenyan Local White. As amostras de prolaminas extraídas de farinhas cozidas da variedade NK283 apresentam dímeros e trímeros não susceptíveis de redução, enquanto as da variedade Kenyan Local White apresentam apenas dímeros com as referidas características.

A maior solubilidade relativa das prolaminas da Kenyan Local White parece estar relacionada com os seus maiores valores de digestibilidade.

Os monómeros constituintes dos polímeros de elevado peso molecular, trímeros e dímeros das amostras de prolaminas extraídas a partir de amostras de farinha de sorgo crua são as kafirinas $\alpha+\gamma$. Apesar de não ter sido detectada a presença de kafirina β nos polímeros obtidos por SDS semi-preparativa, existem vários indícios de que esta kafirina pode fazer parte, em pequenas quantidades, dos aglomerados de elevado peso molecular. As kafirinas α , γ e β estabelecem ligações S-S entre si para formar os aglomerados, visto a sua concentração aumentar após redução das amostras de prolaminas.

A composição dos polímeros, trímeros e dímeros das prolaminas é alterada quando estas são extraídas a partir da farinha cozida em água. Para além dos monómeros podem, também, visualizar-se nos géis de SDS-PAGE, proteínas de 45 kDa e em alguns casos proteínas de 66 kDa indissociáveis quer na presença de DTT quer na presença de ureia. O

aparecimento destas proteínas aquando do cozimento pode estar na base da diminuição da digestibilidade das proteínas de sorgo quando a farinha é submetida a tratamento térmico.

Por RP-HPLC é confirmado o aparecimento de novos aglomerados em amostras de prolaminas extraídas a partir de amostras de farinha cozida, confirmando assim que o cozimento ocasiona modificações na hidrofobicidade das prolaminas.

Na fracção de prolaminas extraídas a partir de farinha de sorgo cozida da variedade NK283, para além do aparecimento de proteínas que não se conseguem dissociar na presença de agente redutor verifica-se, também, o desaparecimento da kafirina β . Este facto, está relacionado com a formação de aglomerados de elevado peso molecular na fracção de prolaminas e de glutelinas.

Os polifenóis contribuem para a solubilidade das prolaminas. Amostras às quais se retiram os polifenóis perdem completamente a solubilidade, enquanto as amostras mais ricas são mais facilmente solubilizadas.

A presença de SDS quebra as ligações proteína – polifenóis. Confirmando-se que, em parte, as ligações entre polifenóis e proteínas poderão ser estabelecidas hidrofobicamente.

Para além das pontes dissulfeto, que já tinham sido referidas na literatura existem, sem dúvida, ligações hidrofóbicas e outras que são estabelecidas entre os monómeros aquando o cozimento.

SDS-PAGE com revelação com Coomassie, pode servir para detectar a presença/ausência de polifenóis neste tipo de amostras.

Em relação às análises por FTIR, tudo indica que o máximo de absorvância da banda correspondente à amida I desloca-se ligeiramente para maiores números de onda quando ocorre aglomeração de monómeros. Parece, ainda, que a presença de kafirina β nos aglomerados pode ser detectada pela presença de um ombro a, aproximadamente, 1627 cm^{-1} .

A fracção de prolaminas 1 da variedade Kenyan Local White apresenta uma polipéptido de 14 kDa, que até à data, não tinha sido identificado como constituinte desta fracção proteica.

TRABALHO FUTURO

"The important thing is to not stop questioning."
Albert Einstein

É no final do trabalho que começam a ‘encaixar as peças’ e se começa a ter uma ideia de quais as alterações, causadas pelo cozimento da farinha, na fracção de prolaminas de sorgo capazes de provocar diminuições tão drásticas de digestibilidade. Nesta fase ficou a vontade de ir mais longe, continuando a investigação nesta área que se mostrou tão interessante e promissora.

Tornar-se imperativo estudar pormenorizadamente o comportamento das kafirinas isoladas, criando modelos que permitam conhecer as interacções que conduzem à formação de aglomerados de elevado peso molecular que estão na base da diminuição da digestibilidade.

Será também interessante caracterizar o polipéptido de 14 kDa e os polifenóis que, nos géis de SDS-PAGE, coram com Coomassie, assim como estudar o tipo de ligação entre compostos fenólicos e prolaminas (nomeadamente com seu polipéptido de 14 kDa) e tentar perceber o papel destes compostos na solubilidade dessa fracção proteica.

Uma vez que os resultados de FTIR de fracções proteicas se revelaram promissores, continua-los em fracções proteicas mais purificadas poderá ser uma prioridade em trabalhos futuros.

De modo a perceber melhor qual a causa da diminuição da digestibilidade da prolaminas de sorgo com o cozimento torna-se importante purificar quantidade suficiente dos aglomerados formados aquando do cozimento para tentar estudar o tipo de ligações que estabelecem.

É imperativo estudar a fracção de glutelinas, o seu melhor conhecimento poderá servir para uma melhor compreensão dos processos que ocorrem na fracção de prolaminas quando a farinha é submetida a transformações como o cozimento e outros processos tradicionais como fermentação e maltagem. Para tal é necessário optimizar as condições de análise por SDS-PAGE; as glutelinas apresentam pesos moleculares bastante elevados e os géis de SDS-PAGE obtidos nas condições descritas ao longo deste trabalho não foram de fácil interpretação.

ANEXO I - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS APLICADA A ESPECTROS DE FTIR DE AMOSTRAS DE PROLAMINAS

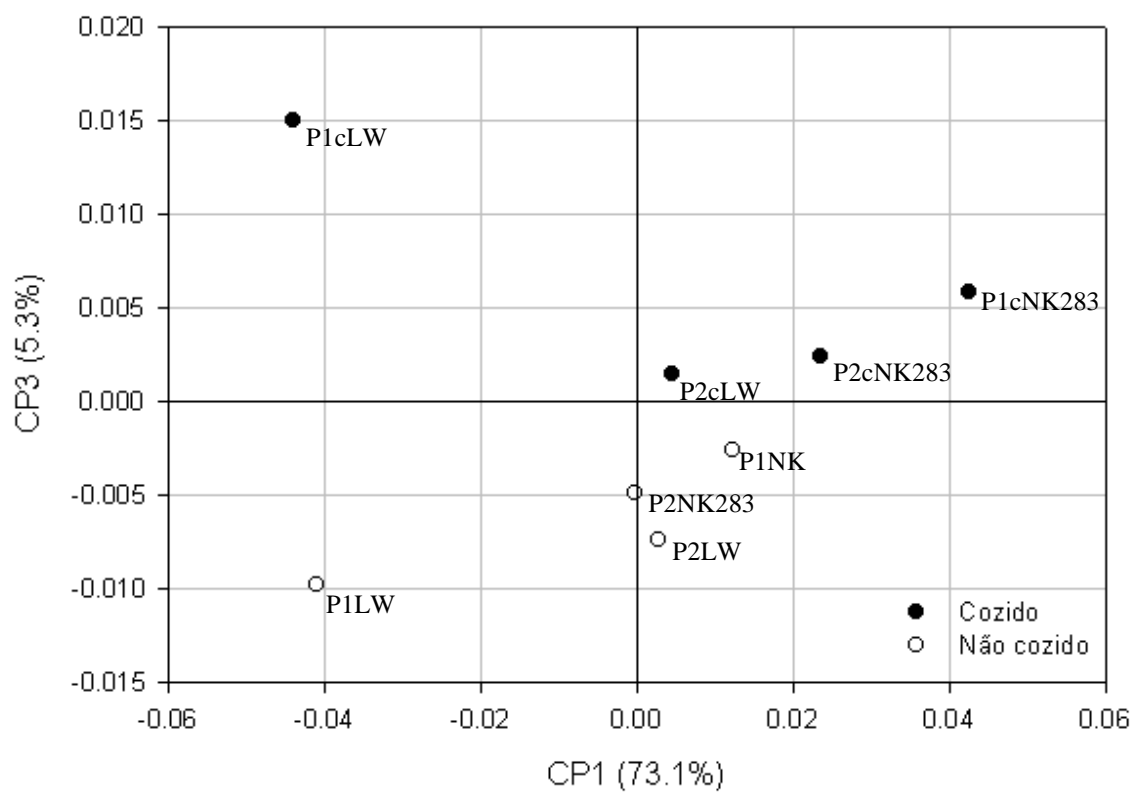


Fig. 34 - Projecção das amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas de farinha crua e cozida das variedades NK283 e Kenyan Local White analisadas por FTIR.

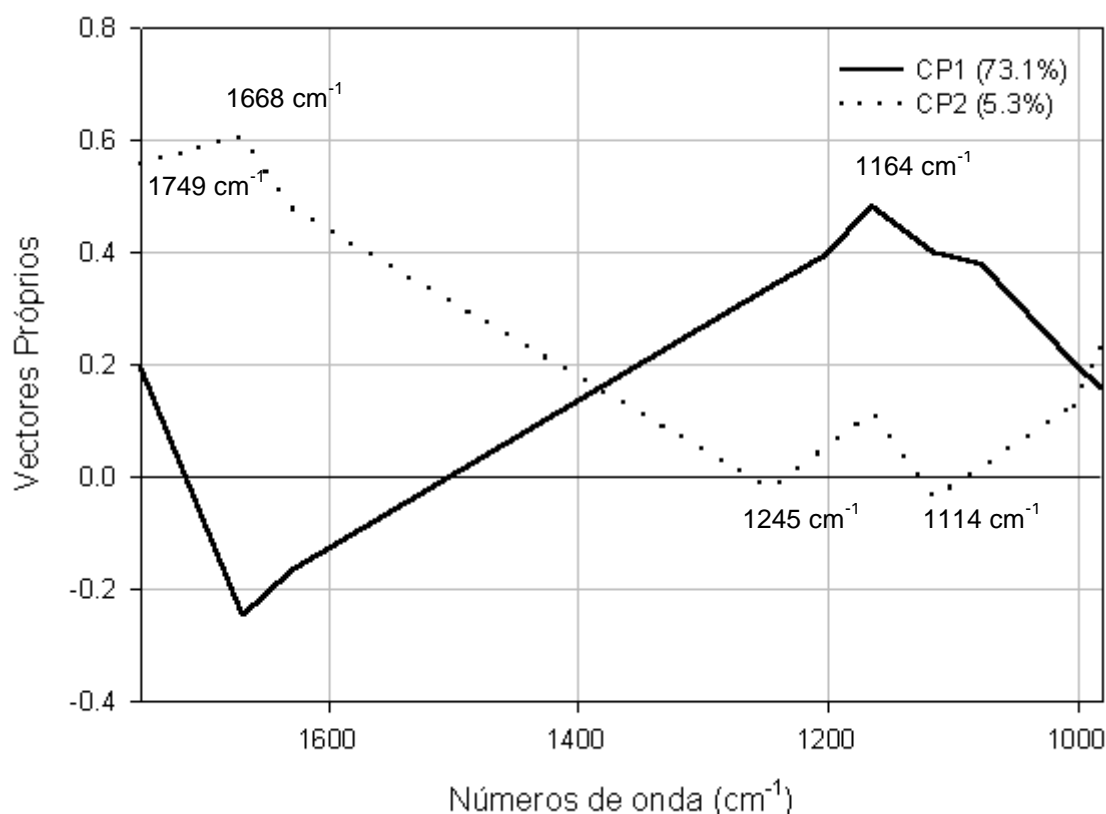


Fig. 35 - Números de onda que contribuem para a discriminação entre espectros de FTIR de amostras de prolaminas extraídas a partir de farinha crua e espectros de FTIR de amostras de prolaminas extraídas de farinha cozida.

Na figura anterior (Fig. 35) estão representados os números de onda que contribuem para a distinção das amostras de prolaminas em cruas e cozidas.

São os comprimentos de onda 1245 e 1114 cm^{-1} que contribuem para a distinção dos espectros de prolaminas extraídas a partir de farinha crua. O pico a 1245 cm^{-1} corresponde ao pico de amida III (correspondente às vibrações de elongação CN, NH no plano, elongação CC e CO no plano) e o pico a 1114 cm^{-1} poderá ser indicador da presença de hidratos de carbono, nomeadamente amido.

Para a distinção de amostras de prolaminas extraídas a partir de farinha cozida contribuem, principalmente, os seguintes números de onda: 1749 e 1668 cm^{-1} . O pico a 1749 cm^{-1} corresponde à presença de ésteres (vibração do grupo $-\text{CO}-\text{O}-$) indicadores da presença de triglicéridos, o pico a 1668 cm^{-1} corresponde ao pico da amida I (indicador de vibrações de elongação CO, elongação CN e CCN deformação).

ANEXO II - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS APLICADA A SDS-PAGE

Aplicou-se análise de componentes principais ao estudo dos perfis electroforéticos das amostras de prolaminas 1 e 2 das duas variedades de sorgo tendo em vista facilitar a interpretação e comparação do comportamento electroforético do referido conjunto de amostras.

Prolaminas da variedade NK283

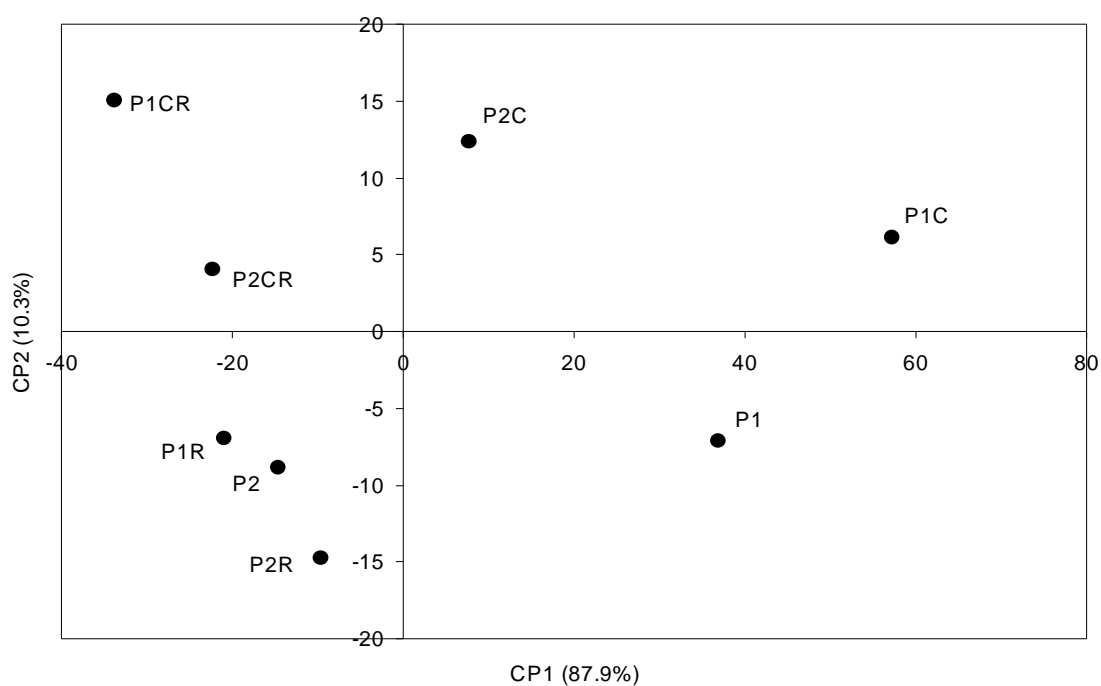


Fig. 36 - Projecção das amostras da variedade NK283.

No caso do conjunto de amostras referentes à variedade NK283 (Fig. 36) nota-se que a amostra de prolaminas 1 (P1) está localizada num quadrante distinto de todas as outras, é portanto distinta das restantes amostras de prolaminas. Uma vez que esta amostra está localizada num quadrante distinto do da amostra de prolaminas 1 extraídas a partir da amostra de farinha cozida em água (P1C), confirma-se que as amostras de prolaminas 1 são afectadas com o cozimento.

As amostras de P1C e P2C (prolaminas 2 extraídas a partir de farinha cozida) estão localizadas no mesmo quadrante. A proximidade destas amostras parece indicar que o cozimento provoca alterações na fracção de prolaminas de tal forma que amostras extraídas na presença de agente redutor (P2C) apresentam semelhanças com amostras extraídas em condições não redutoras. Estas semelhanças poderão, eventualmente, estar relacionadas com a formação de aglomerados promovida com o cozimento.

A amostra de prolaminas 2 (P2) está localizada no quadrante também ocupado pelas amostras de prolaminas 1 e 2 reduzidas (P1R e P2R). Este resultado poderá ser usado para se especular acerca da eficiência dos processos de diálise e liofilização. Estes processos parecem não promover oxidação das amostras. A extracção da amostra P2 ocorre em meio redutor e quando, após diálise e liofilização, esta amostra é estudada na sua forma reduzida o seu comportamento não é alterado significativamente.

Num outro quadrante estão localizadas as amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de amostra de farinha cozida e que foram submetidas a redução previamente à análise por SDS-PAGE (P1CR e P2CR). Estas amostras estão consideravelmente distanciadas das amostras P1R e P2R. Pode justificar-se esta distância tendo como base a formação de aglomerados proteicos com o processo de cozimento da farinha os quais se mantêm inalterados com a redução.

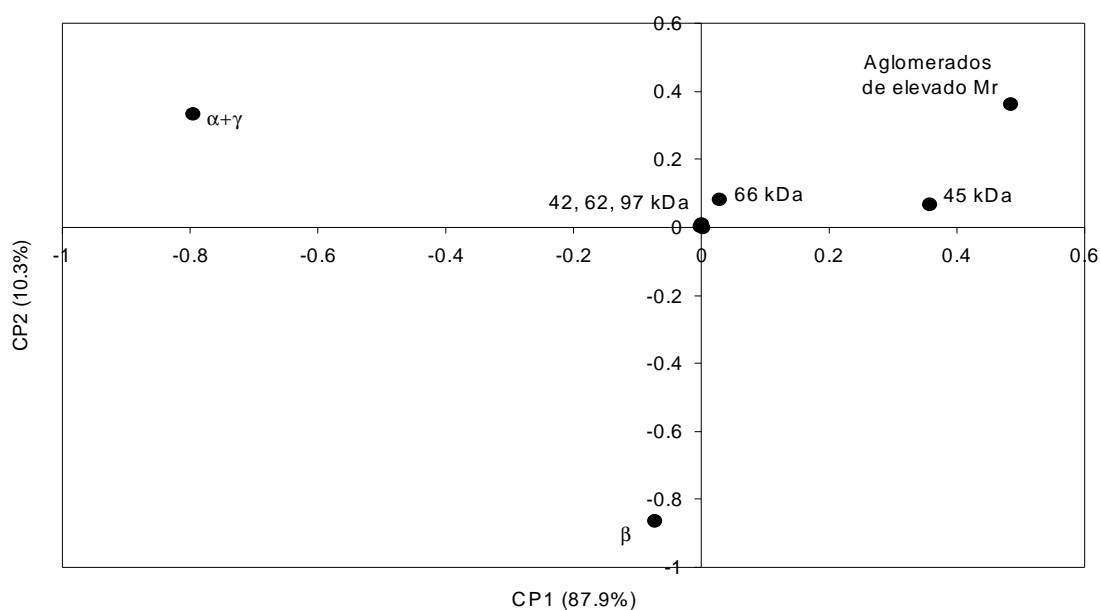


Fig. 37 – Coordenadas factoriais referentes às amostras da variedade NK283.

Por análise da figura anterior (Fig. 37) consegue identificar-se quais os polipéptidos constituintes da fracção de prolaminas responsáveis pela distinção apresentada na Fig. 36.

Para a caracterização das amostras P1C e P2C contribuem os aglomerados de elevado peso molecular; são estas as amostras mais ricas neste componente proteico. Verificou-se, anteriormente, que aquando do cozimento da farinha a é favorecido o aparecimento dos referidos aglomerados na fracção de prolaminas.

A kafirina β está relacionada com as amostras P1R, P2R e P2 estas amostras, estudadas por SDS-PAGE na sua forma reduzida ou então extraídas na presença de agentes redutores, apresentam quantidade considerável dessa kafirina. Estas três amostras não apresentam na sua composição aglomerados de elevados peso molecular; como se pode verificar pela análise da Fig. 37 estes componentes proteicos não apresentam qualquer contribuição para a distinção destas amostras.

Para a caracterização das amostras P1CR e P2CR contribuem as kafirinas $\alpha + \gamma$. A quantidade destas kafirinas é incrementada uma vez que estas amostras são estudadas por SDS-PAGE em condições redutoras.

Prolaminas da variedade Kenyan Local White

O conjunto de amostras referentes às prolaminas da variedade de sorgo Kenyan Local White apresenta uma distribuição distinta da variedade NK283.

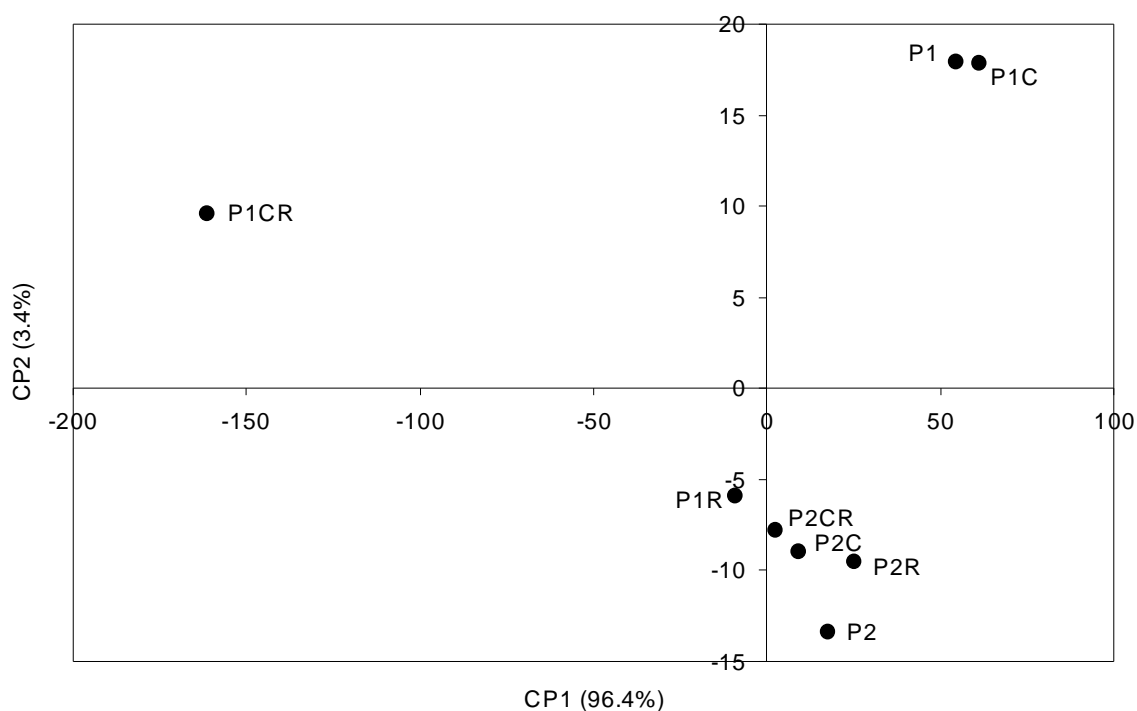


Fig. 38 - Projecção das amostras da variedade Kenyan Local White.

A amostra P1 localiza-se no mesmo quadrante do da amostra P1C; esta proximidade pode ser explicada pelo facto das prolaminas desta variedade de sorgo não parecerem tão susceptíveis ao cozimento como as da variedade NK283.

A amostra P1CR está localizada num quadrante distinto de todas as outras amostras, nomeadamente, da amostra P1R. A distância entre as duas amostras poderá estar relacionada com a formação de aglomerados proteicos que não são afectados com a redução.

No que diz respeito às amostras de P2, P2R, P2C e P2CR estão localizadas no mesmo quadrante o que parece revelar, por um lado, a não oxidação das amostras aquando

da diálise e da liofilização e, por outro lado, a aparente resistência estrutural da fracção de prolaminas 2 desta variedade de sorgo face ao cozimento (Fig. 38).

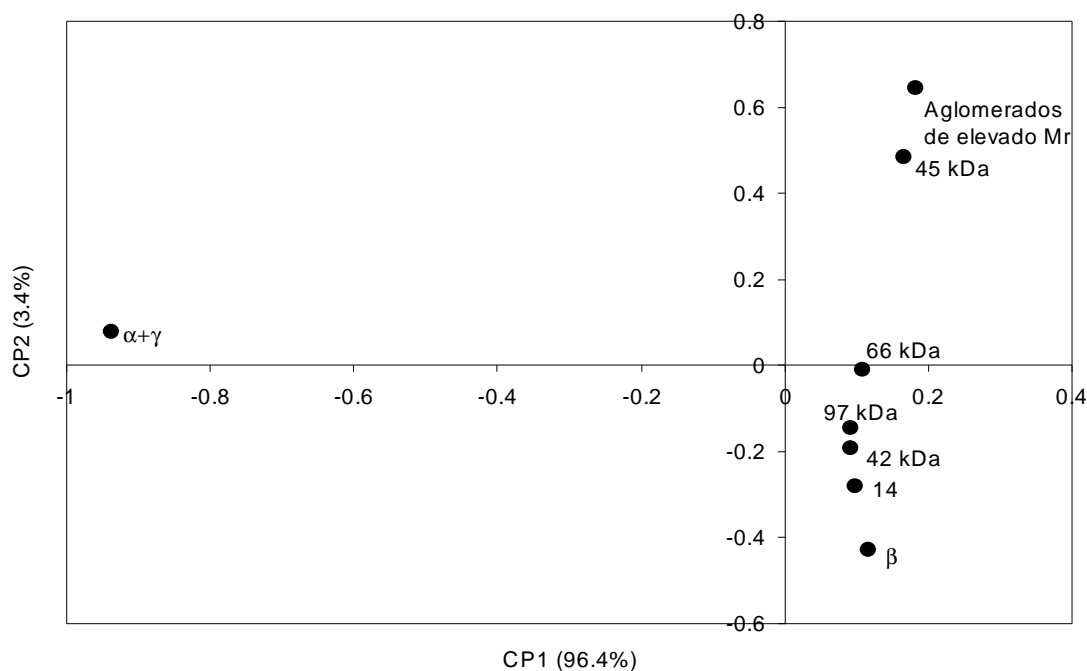


Fig. 39 - Coordenadas factoriais referentes às amostras da variedade Kenyan Local White.

Analisando a figura anterior (Fig. 39) consegue-se saber quais os polipéptidos constituintes da fracção de prolaminas responsáveis pela distinção das amostras representada na Fig. 38.

A distinção da amostra P1CR deve-se à presença de grande quantidade de kafirinas $\alpha + \gamma$. Estas kafirinas são libertadas dos polímeros, trímeros e dímeros por redução.

Os aglomerados de elevado peso molecular e dos polipéptido de 66 e 45 kDa são responsáveis pela caracterização das amostras P1 e P1C uma vez que estão presentes em grande quantidade na sua composição.

Para a caracterização das amostras P1R, P2CR, P2C, P2R e P2 contribui a presença dos polipéptidos de 42 e 14 kDa e da kafirina β . Para a caracterização destas amostras contribui ainda a ausência do polipéptido de 97 kDa. Neste quadrante estão localizadas amostras extraídas em condições redutoras ou que foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras, é então normal que nenhuma delas apresente na sua composição o polipéptido de 97 kDa. A presença da amostra P2C no conjunto destas amostras sugere que o cozimento não afecta intensamente a fracção das prolaminas 2 extraídas a partir desta variedade de sorgo.

Conclusões

A aplicação de análise de componentes principais apresenta grandes potencialidades para o auxílio da interpretação de resultados de SDS-PAGE. Esta técnica permite a comparação simultânea de perfis electroforéticos de um grande conjunto de amostras.

Com o auxílio deste método de análise consegue-se verificar que os dois conjuntos de prolaminas das duas variedades de sorgo apresentam comportamentos distintos.

A fracção de prolaminas da variedade NK283 é mais afectada com o cozimento do que a variedade Kenyan Local White. Este facto foi verificado por comparação das distâncias entre amostras de prolaminas 1 e 2 extraídas a partir de farinha crua e cozida. No caso da variedade NK283 as distâncias os entre pares de amostras P1 / P1C, P2 / P2C, P1R / P1CR e P2R / P2CR é consideravelmente superior do que no caso da variedade Kenyan Local White.

ANEXO III - PRODUTOS ALIMENTARES À BASE DE SORGO

Cerveja Opaca (Utshwala, Joala)

Países produtores:	África do Sul
Matéria prima:	sorgo maltado e água.
Aspecto:	opaco devido à presença de partículas de amido, leveduras e material do grão de malte em suspensão.
Cor:	castanha rosada devido à presença de pigmentos do malte (antocianinas).
Sabor:	azedo, devido a fermentação ácido láctica. Não é adicionado lúpulo.
Teor alcoólico:	3 % (v/v).

Kisra

País produtor:	Sudão
Ingredientes:	farinha de sorgo, água, inoculo (massa previamente fermentada) (9:2:1).
Procedimento:	misturar os ingredientes, deixar fermentar 18 horas, amassar, cozer cerca de 100 ml de massa em placa de ferro quente, em simultâneo moldar com uma espátula de madeira de modo a obter-se uma película com pouca espessura, deixar cozer cerca de ½ minuto de cada lado.
Aspecto:	pão levedado pouco espesso.

Ugali

País produtor:	Kénia, Tanzânia e Uganda.
Ingredientes:	farinha de sorgo e água (2-3:4-5).
Procedimento:	ferver a água, adicionar aos poucos a farinha agitando constantemente, deixar ferver 2 minutos e cozinhar lentamente durante 15 a 20 minutos.
Aspecto:	papa consistente.

Tortilla

País produtor:	América Central e México.
Ingredientes:	grão de sorgo e solução de lima 0,5 % (3:1).
Procedimento:	misturar o grão de sorgo com a solução de lima, cozer 3-10 minutos até ao ponto de ebulição, deixar repousar 4 horas, fazer bolas de massa e espalma-las de modo a obter um produto final com cerca de 5 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, cozer as <i>tortillas</i> de ambos os lados em <i>comal</i> .
Aspecto:	pão não fermentado.

Tô alcalino

País produtor:	Nigéria.
Ingredientes:	farinha de sorgo, água, cinza de madeira (1:4:0,1).
Procedimento:	ferver a água, adicionar-lhe a cinza, juntar metade da farinha, agitar até se obter uma mistura homogénea, deixar ferver 8 minutos, adicionar aos poucos a farinha restante até á consistência desejada, deixar cozer em lume brando cerca de 12 minutos.
Aspecto:	papa consistente.

Pão indiano (Roti)

País produtor:	Índia.
Ingredientes:	farinha de sorgo, água, sal a gosto e azeite (1:4:0,1).
Procedimento:	misturar os ingredientes e amassar até se obter uma massa com a consistência desejada, espalmar a massa para se obter uma única peça circular pouco espessa, cozer em <i>parrilla</i> de ambos os lados (após adição pequena quantidade de água) durante cerca de 30 minutos.
Aspecto:	pão não levedado pouco espesso.

CAPÍTULO V – BIBLIOGRAFIA

“Those who cannot remember the past are condemned to repeat it.”
George Santayana

Adams, C.A. e Novellie, L. (1975) Acid hydrolase and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Plant Physiol.*, 55:7-11.

Ahuja, V.P.; Singh, J. e Naik, M.S (1970) Amino acid balance of proteins of maize and sorghum, *Indian J. Genet. Plant Breed*, 30:727-731.

Aisien, A.O.; Palmer, G.H. e Stark, J.R. (1986) The ultrastucture of germinating sorghum and millet grains, *J. Inst. Brew.*, 92:162-167.

Almeida-Domingues, H.D.; Serna-Saldivar, S.O.; Gomez Machado, M.H. e Rooney, L.W. (1993) Production and nutritional value of weaning foods from mixtures of pearl millet and cowpeas, *Cereal Chem.*, 70:14-18.

Axtell, J.D.; Kirleis, A. W.; Hassen, M.M.; Mason, N.C.; Mertz, E.T. e Munck, L. (1981) Digestibility of Sorghum Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 1333-1335.

Barros, A.S.; Safar, M.; Devaux, M.F.; Robert; Bertrand, D. e Rutledge, D.N. (1997) Relations between mid-infrared and near-infrared spectra detected by analysis of variance of an intervariable matrix, *App. Spectroscopy*, 51:1384-1393.

Barros, E.G.; Takasaki, K.; Kirleis, A.W. e Larkins, B.A (1991) Nucleotide sequence of cDNA clone encoding γ -kafirin protein from *Sorghum bicolor*, *Plant. Physiology*, 97:1606-1607.

Beckwith, A.C. (1972) Grain sorghum glutelin: isolation and characterisation, *J. Agr. Food Chem.*, 20:761-764.

Bietz, J.A. (1985) High performance liquid chromatography: how proteins look in cereals, *Cereal Chem.*, 62:201-212.

Bullard, R.W.; York, J.O. e Kilburn, S.R. (1981) Polyphenolic changes in ripening bird resistant sorghums, *J.Agric. Food Chem.*, 29:973-981.

Butler, L. (1982) Relative degree of polymerisation of sorghum tannin during seed development and maturation, *J.Agric. Food Chem.*, 30:1090-1094.

Chandrasekher, G. e Kirleis, A.W. (1988) Influence of protein on starch gelatinization in sorghum, *Cereal Chem.*, 65:457-462.

Chavan, J.K. e Kadam, S.S. (1989) Nutritional improvement of cereals by fermentation, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28 (5):349-400.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D. (1985) Propriétés général des proteines *in* Protéines alimentaires, Technique et Documentation – Lavoisier, 12-24.

Chibber, B.A.K.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1978) Effects of dehulling on tannin content, protein distribution and quality of high and low tannin sorghum, *J. Agric. Food Chem.*, 26:679-683.

Chibber, B.A.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1980) *In vitro* protein digestibility of high tannin sorghum at different stages of dehulling, *J. Agric. Food Chem.*, 28:160-161.

Chung, K.C. e Pomeranz, Y. (1985) Amino acids in cereal proteins and protein fractions *in* Digestibility and Amino Acids Availability in Cereals and oilseeds (J. Finley and D. Hopkins, eds) American association of Cereal Chemist, St. Paul, MN, USA, 65-107.

Daniel, V.A.; Leela, R.; Doraiswamy, T.R.; Rajalakshmi, D.; Rao, S.V.; Swaminathan, M. e Parpia, H.A.B. (1966) *J. Nutr. Diet.* 3, 10-14.

Eggum, B.O.; Monowar, L.; Bach Knudsen, K.E.; Munck, L. e Axtell, J. D. (1983) Nutritional quality of sorghum foods from Suthan, *J. Cereal Sci.*, 1:127-137.

El Nour, I.N.A.; Peruffo, A.D.B. e Curioni, A. (1998) Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour, *J. Cereal Sci.*, 28:197-207.

El Tiany, A.H.; Abdel Gadir, A.M. e El Hidai, M. (1979) Sorghum fermented kisra bread, I.- Nutritive value of kisra, *J. Sci. Food Agric.*, 30:859-863.

Elkin, G.E.; Freed, M.B.; Hamaker, B.R.; Zhang, Y. e Parsons, C.M. (1996) Condensed tannins are only responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 44:848-853.

FAO (1995) El sorgo y el mijo en la nutrición humana, Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentacion, Roma.

Featherston, W.R. e Rogler, J.C. (1975) Influence of tannins on the utilisation of sorghum grain by rats and chicks, *Nutr. Rep. Int.*, 11:491-494.

Goldstein, J.L. e Swain, T. (1963) Methods of determining the degree of polimerization of flavans, *Nature*, 198:587-590.

Graham, G.G. e MacLean, W.C. (1980) Evaluation of the protein quality and digestibility of sorghum in the diet of infants, Progress Report to S.G.Kahn, Sci. Nutr. Officer, Office of Nutr., Agency for International Development (AID Washinton, D.C.).

Grimmer, H.R.; Parbhoo, V. e McGrath, R.M. (1992) Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from *Sorghum bicolor* grain, *J. Sci. Food Agric.*, 59:251-256.

Guragossian, V.; Chiber, B.A.K.; Van Scoyoc, S.; Jambunathan, R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1978) Characteristics of protein from normal high-lysine and high tannin sorghums, *J. Agric. Food Chem.*, 26:219-223.

Hagerman, A.E. e Butler, L.G. (1989) Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin, *J. Agric. Food Chem.*, 15:1975-1810.

Hamaker, B.R.; Mertz, E.T.; Kirleis, A.W. e Axtell, J.D. (1986) Effect of cooking on the protein profiles and pepsin digestibility of sorghum and maize, *J. Agric. Food Chem.*, 34:647-649.

Hamaker, B.R.; Kirleis, A.W.; Butler, L.G.; Axtell, J.D. e Mertz, E.T. (1987) Improving the *in vitro* Protein Digestibility of Sorghum With Reducing Agents, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:626-628.

Hamaker, B.R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1994) Effect of extrusion on sorghum kafirin solubility, *Cereal Chem.*, 71:515-517.

Haslam, E. (1989) Plant polyphenols, Cambridge University Press, Cambridge, 154-219.

Hoseney, R.C.; Davis, A.B. e Harbers, L.H. (1974) Pericarp and endosperm structure of sorghum grain shown by scanning electron microscopy, *Cereal Chem.*, 51:552-558.

Hoseney, R.C.; Davis, A.B. e Dendy, .(1981) Sorghum and millets *in* Advances in cereal science and technology, vol. IV (Y. Pomeranz, ed.) American Association of Cereal Chemist, St. Paul.

Hoseney, R.C.; Andrews, D.J. e Clark, H. (1987) Sorghum and pearl millet *in* Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement (R.A. Olson and

K.J. Frey, eds.) American Society of Agronomy, Crop Science of America, Soil Science of America, Madison, Wisconsin, USA.

Hubbard, J.E.; Hall, H.H. e Earle, F.R. (1950) Composition of the component parts of the sorghum kernel, *Cereal Chem.*, 27:415-420.

Hulse, J.H.; Laing, E.M. e Earle, F.R. (1980) Sorghum and the Millets: Their Composition and Nutritive Value, Academic Press, New York.

Jambunathan, R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1975) Fractionation of soluble proteins of high-lysine and normal sorghum grain, *Cereal Chem.*, 52:119-121.

Jambunathan, R.; Butler, L.G.; Bandyopadhyay, R. e Mughogho, L.K. (1986) Polyphenol concentrations in grain, leaf and callus tissues of mould susceptible and mould-resistant sorghum cultivars, *J.Agric. Food Chem.*, 34:425-429.

Jolliffe, I.T. (1986) Principal component analysis, Springer, New York.

Kheptarpaul, N. e Chauhan, B.M. (1990) Effect of germination and fermentation on in vivo starch protein digestibility of pearl millet, *J. Food Sci.*, 55:883-884.

Kurien, P.P.; Narayanarao, M.; Swaminathan, M. e Subrahmanyam, V. (1960) The metabolism of Nitrogen, Calcium and Phosphorus in Undernourished children., *Br. J.Nutr.*, 14:336-345.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.

Landry, J. e Moureaux, T. (1970) Heterogeneity des glutelines du grain de maïs: extraction selective et composition en acides aminés des trois fractions isolées, *Bull. Chim. Biol.*, 52:1021:1037.

Mazhar, H. e Chandrashekar, A. (1993) Differences in kafirin composition during endosperm development and germination in sorghum cultivars of varying hardness, *Cereal Chem.*, 70:667-671.

Marzhar, H. e Chandrashekar, A. (1995) Quantification and distribution of kafirins in the kernels of sorghum cultivars varying in endosperm hardness, *J. Cereal Sci.*, 21:155-162.

Mitarau, B.N.; Reichert, R.D. e Blair, R. (1985) Protein and amino acid digestibility for chickens of reconstituted and boiled sorghum varying in tannins contents, *Poultry Sci.*, 64:101-106.

Mukuru, S.; Monyo, E.; Ejeta, G.; Hassen, M.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1988) Traditional food processing technologies in East Africa improve nutritive value of high tannin sorghums, *Agron. Abstr.*, 163.

Naik, M.S.(1968) Lysine and tryptophan in protein fractions of sorghum, *Indian J. Genet. Plant Breed*, 28:142-146.

Nwasaru, M.A.; Reichert, R. D.; e Mukuru, S.Z. (1988) Factors affecting the abrasive dehulling efficiency of high-tannin sorghum, *Cereal Chem.*, 65:171-174.

Oh, H.I.; Hoff, J.E.; Armstrong, G.S. e Haff, L.A. (1980) Hydrophobic interactions in tannin-protein complexes, *J. Agric. Food Chem.*, 28:394-398.

Ollitrault, P.; Escoute, J. e Noyer, J.-L. (1989) Polymorphism of enzymes in sorghum. I., *Agron. Trop.*, 44:203-210.

Oria, M.P.; Hamaker, B.R. e Shull, J.M. (1995) Resistance of sorghum α , β and γ kafirins to pepsin digestion, *J. of Agric. Food Sci.*, 43:2148-2153.

Palmer, G.-H.; Etokakpan, O.U. e Igyor, M.A. (1989) Review: Sorghum as brewing material, *Mircen. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5:265-275.

Paulis, J.W. e Bietz, J. A. (1988) Characterization of zeins fractionated by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Cereal Chem.*, 65:215-222.

Price, M.L. e Butler, L.G. (1979 a) Rapid visulal estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *J.Agric. Food Chem.*, 25:1268-1273.

Price, M.L.; Stromberg, A. M. e Butler, L. G. (1979 b) Tannin content as a function of grain maturity and drying conditions in several varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *J.Agric. Food Chem.*, 27:1270-1274.

Price, M.L.; Butler, L.G.; Rogler, J.C. e Featherston, W.R. (1979 c) Overcoming the nutritionally harmful effects of tannins in sorghum grain by treatment with inexpensive chemicals, *J.Agric. Food Chem.*, 27:441.

Purseglove, J.W. (1972) Tropical crops: monocotiledons, vol.1, Long-man Group Limited, Londres.

Rom, D.L.; Shull, J.M.; Chandrashekar, A. e Kirleis, A.W. (1992) Effects of cooking and treatment with sodium bisulfite on *in vitro* protein digestibility and microstructure of sorghum flour, *Cereal Chem.*, 69:178-181.

Rooney, L.W. e Serna-Saldivar, S.O. (1991) Sorghum *in* Handbook of cereal science and technology (K.J. Lorenz and K. Klup, eds.) Marcel Dekker, New York.

Sastry, L.V.S.; Paulis, J.W.; Bietz, J. A. e Wall, J.S. (1986) Genetic variation of storage protein in sorghum grain: studies by isoelectric focusing and high-performance liquid chromatography, *Cereal Chem.*, 63:420-427.

Sekinger, H.L. e Wolf, M.J. (1973) Sorghum protein ultrastructure as it relates composition, *Cereal Chem.*, 50:455-465.

Serena-Saldivar, S.O.; Tellez-Giron, A.; Rooney, L.W. e Tanksley, T.D. (1987 a) Effects of lime cooking on energy and protein digestibilities of maize and sorghum, *Cereal. Chem.*, 64:247-252.

Serena-Saldivar, S.O.; Tellez-Giron, A. e Rooney, L.W. (1987 b) Production of tortilla chips from sorghum and maize, *J. Cereal Sci.*, 8:275-284.

Serna-Saldivar, S.O.; Knabe, D.A.; Rooney, L.W.; Tanksley, T.D. e Sproule, A.M. (1988) Nutritional value of sorghum and maize tortillas, *J. Cereal Sci.*, 7:83-94.

Serena-Saldivar, S.O.; Clegg, C. e Rooney, L.W. (1994) Effects of paraboiling and decortication on the nutritional value of sorghum and pearl millet, *J. Cereal Sci.*, 19:83-89.

Serena-Saldivar, S.O. e Rooney, L.W. (1995) Structure and chemistry of sorghum and millets in *Sorghum and millets: chemistry and technology* (D.A.V. Dendy, ed.) American Association of cereal chemists Inc., St. Paul, Minesota, USA.

Shewry, P.R.; Tathan, A.S. e Fido, R.J. (1995) Separation of plant Proteins by Electrophoresis. in *Plant Gene Transfer and Expression Protocols* (H. Jones, ed.) Humana Press, Totowa, New Jersey, 399-418.

Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1991) Proposed nomenclature for the alcohol soluble proteins of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on molecular weight, solubility and structure, *J. Agric. And Food Chem.*, 39:83-87.

Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1992) Purification and immunocytochemical localisation of kafirins in *Sorghum bicolor* endosperm, *Protoplasma*, 171:64-74.

Spencer, C.M.; Cai, Y.; Martin, R.; Geffney, S.H.; Goulding, P.N.; Magnolato, D.; Lilley, T.H. and Haslam, E. (1988) Polyphenol complexation – some thoughts and observations, *Phytochemistry*, 27:2397-2409.

Sullins, R.D. e Rooney, L.W. (1977) Pericarp and endosperm structure of pearl millet in Proceedings of a simposium on sorghum and millets for human food (Dendy, D.A.V.) Viena, 11-12 of May

Taylor, J.R.N. (1983) Effect of malting on protein composition of sorghum, *J. Sci. Food Agric.*, 34:885-812.

Taylor, J.R.N., Schüssler, L. e Liedemberg, N.V.D.W. (1984) Location of zein-2 and cross linked kafirin in maize and sorghum protein bodies, *J. of Cereal Science*, 2:249-255.

Taylor, J.R.N.; Noveillie, L. e Liebenberg, N.W. (1985) Protein body degradation in the starchy endosperm of germinating sorghum, *J. Exp. Biol.*, 36:1287-1295.

Taylor, J.R.N. e Schüssler, L. (1986) The protein composition of the different anatomic parts of sorghum grain, *J. Cereal Sci.*, 4:361-369.

Taylor, J.R.N.; Novellie, L. e Liebenberg, N.V.D.W. (1984 a) Sorghum protein bodies composition and ultrastructure, *Cereal Chem.*, 61:69-73.

Taylor, J.R.N.; Schussler, L. e Walt, W.H. (1984 b) Fractionation of proteins from low-tannin sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.*, 32:149-154.

Taylor, J.R.N. e Taylor, J. (1998) Relatório anual do projecto europeu INCO IC 18 CT 960051.

Terril, T.H.; Rowan, A.M.; Douglas, G.B. e Barry, T.N. (1992) Determination of extractable and condensed tannin concentration in forage plants, proteins concentrate meals and cereals grain, *J.Sci. and Food Agric.*, 58:321-329.

Van-Burns e Robinson (1969) Formation of complexes between protein and tannic acid, *J. Agric. Food Chem.*, 17:772-777.

Vivas-Rodriguez, N.E.; Serna-Saldivar, S.O.; Waniska, R.D. e Rooney, L. W. (1990) Effect of tortilla chip preparation on the protein fractions of quality protein maize, regular maize and sorghum, *J. Cereal Sci.*, 12:289-296.

Vivas-Rodriguez, N.E.; Waniska, R.D. e Rooney, L.W. (1987) Effect of tortilla production on proteins in sorghum and maize, *Cereal Chem.*, 64:384-389.

Vivas-Rodriguez, N.E.; Waniska, R.D. e Rooney, L.W. (1992) Effects on protein in sorghum , maize and pearl millet when processed into acidic and basic Tô, *Cereal Chem.*, 69:673-676.

Wallace, J.C.; Lopes, M.A.; Paiva, E. e Larkins, B. A. (1990) New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2, *Plant Physiol.*, 92:191-196.

Warsi, A.S. e Wright, B.C. (1973) Effects of rates and methods of nitrogen application of sorghum grain, *Indian J. Agric. Sci.*, 43:722-726.

Watson, T.G. e Novellie, L. (1975) The development of amylase and maltase during the malting *Sorghum vulgare*, *Agrochemophysics*, 7:61-64.

Watterson, J.J.; Shull, J.M. e Kirleis, A.W. (1993) Quantitation of α -, β - and γ -kafirins in vitreous and opaque endosperm of *Sorghum bicolor*, *Cereal Chem.*, 70:452-457.

Weaver, C.A.; Hamaker, B.R. and Axtell, J.D. (1998) Discovery of grain sorghum germ plasm with high uncooked and cooked *in vivo* protein digestibility, *Cereal Chem.*, 75:665-670.

Wu, Y.V. e Wall, J.S. (1980) Lysine content of protein increased by germination of normal and high lysine sorghum, *J. Agric. Food Chem.*, 28:455-458.

Yau, J.C.; Bockholt, A.J.; Smith, J.D.; Rooney, L.W. and Waniska, R.D. (1999) Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content, *Cereal Chem.*, 76:668-672.

Yan, Q. and Bennick (1995) Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva, *Biochem. J.*, 311:341-347.

Young, R.; Haidara, M.; Rooney, L. W. e Waniska, R.D. (1990) Paraboiled sorghum: development of a novel decorticated product, *J. Cereal Sci.*, 11:277-289.

“The illiterate of the 21st century will not be those who cannot read and write, but those who cannot learn, unlearn, and relearn.”

Alvin Toffler

